LETICIA ASSIS PEREIRA VILELA

Investigação genética dos tumores corticais adrenais produtores de aldosterona

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

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Madson Queiroz de Almeida

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

Vilela, Leticia Assis Pereira
Investigação genética dos tumores corticais adrenais produtores de aldosterona / Leticia Assis Pereira Vilela. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientador: Madson Queiroz de Almeida.

Descritores: 1.Hipertensão 2.Aldosterona 3.Hiperaldosteronismo 4.Adenoma adrenocortical 5.Mutação 6.Canais iônicos

USP/FM/DBD-106/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

"Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo."

Martin Luther King

Aos meus pais, Maurilio e Mara Zilda, por todo amor e pelos exemplos de trabalho, dedicação e responsabilidade.

Aos meus irmãos, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando, desde o início deste trabalho.

Ao meu noivo, Ulisses, por compartilhar mais esta conquista comigo.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho se tornou possível com a ajuda de pessoas que estiveram ao meu lado neste período, e a essas pessoas aqui estão os meus agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Madson Queiroz de Almeida, pela valiosa orientação e pelo exemplo como pesquisador e profissional competente e dedicado. Por estar sempre disponível quando precisei, me ajudando com seu vasto conhecimento e experiência. Agradeço-lhe pela atenção, apoio e ensinamentos. Sua orientação tornou possível a construção do nosso trabalho.

À Profa. Dra. Maria Cândida Barisson Villares Fragoso, por quem eu tenho grande admiração, pelo exemplo de altruísmo e de assistência aos pacientes. Obrigada por todos os ensinamentos no Ambulatório de Suprarrenal.

Às Profas. Dras. Berenice Bilharinho de Mendonça e Ana Claudia Latrônico, por todo apoio a este trabalho e por serem grandes incentivadoras da busca pelo conhecimento e da pesquisa.

À Profa. Dra. Maria Claudia Nogueira Zerbini, pela colaboração e pelos ensinamentos durante a revisão do estudo anatomopatológico deste trabalho.

Às equipes da Unidade de Hipertensão do Instituto do Coração, da Unidade de Endocrinologia Geral, do Serviço de Nefrologia, do Serviço de Urologia e do Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da FMUSP, em especial aos Drs. Luiz Bortolotto, Luciano Drager, Maria Adelaide Pereira, Andrea Abreu, Giovanio Silva, José Luis Chambô, Victor Srougi, Fábio Tanno, Francisco Carnevale, Aline Cristine Cavalcante, Bruna Pilan e Fernando Yamauchi, pela valiosa colaboração.

Ao Dr. Antônio Lerário, pelas contribuições na análise de bioinformática.

À equipe do Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala da FMUSP (SELA), pela competência e empenho na realização do sequenciamento paralelo em larga escala.

A todas as funcionárias do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42, em especial à Mirian, Luciana, Andresa, Nilda, Rosangele, Cidinha, Fran e Cristina, por toda a ajuda dispensada e todo o trabalho que desempenham para o ótimo funcionamento do laboratório.

A todos os colegas do LIM42 e da Unidade de Suprarrenal, com quem convivi durante os anos do doutorado e que se tornaram grandes amigos: Juliana Moreira, Anna Flávia Benedetti, Bruna Azevedo, Thatiana Silva, Caroline Caetano, Rafael Loch, José Antônio Faria, João Luiz Madeira, Delanie Macedo, Beatriz Mariani, Augusto Garcia, Marcela Rassi, Vânia Balderrama, Amanda Meneses e Janaina Petenuci. Obrigada pela companhia sempre agradável, por toda ajuda nos momentos de dificuldade e pelo incentivo constante.

Às amigas Mariana Funari e Mônica França, pela paciência em transmitir a mim os conhecimentos do mundo da biologia molecular e pela amizade construída durante a nossa convivência.

Às queridas amigas pós-graduandas: Isabela Biscotto, pelo companheirismo, carinho e amizade verdadeira; Helaine Charchar por sua amizade fiel e pela anfitriã carinhosa que foi durante os últimos anos; Nathalia Lisboa pela amizade sincera e por todo apoio durante a execução deste trabalho.

À querida amiga Gabriela Resende, que se tornou uma irmã enquanto estivemos juntas em São Paulo. Obrigada pela amizade, pelos ensinamentos de bancada e por se fazer presente mesmo quando distante.

À minha querida tia Marilia Lima, pelo carinho e companheirismo. Obrigada por sempre incentivar meu crescimento pessoal e profissional e pela assistência ofertada durante os anos em que morei em São Paulo.

À minha família, meus pais, irmãos e meu noivo, pelo apoio e pela compreensão do tempo de convívio muitas vezes sacrificado para a realização deste projeto. Obrigada por serem meus maiores incentivadores e por acreditarem no meu potencial. Agradeço, em especial, à minha irmã Nathalia pela colaboração para a edição das figuras deste trabalho.

Aos pacientes e seus familiares, pela boa vontade em participar deste projeto.

Agradecimentos Especiais

À **FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Auxílio Pesquisa: 2015/17049-8)** e ao **CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Auxílio Pesquisa: 403256/2016-0)**, que aprovaram e financiaram a execução deste projeto, pela confiança que dedica aos pesquisadores e à pesquisa científica.

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. Serviço 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 Biblioteca e Documentações; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas
Lista de tabelas
Lista de figuras
Resumo
Abstract

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Hiperaldosteronismo Primário 2
1.1.1 Triagem e confirmação diagnóstica 5
1.1.2 Determinação da etiologia 7
1.1.3 Tratamento 8
1.2 Aspectos Genéticos do HP 10
1.2.1 HP familial 11
1.2.2 Genética dos aldosteronomas 15

2 OBJETIVOS 19
2.1 Objetivo Geral 20
2.2 Objetivos Específicos 20

3 MÉTODOS 21
3.1 Considerações Éticas 22
3.2 Pacientes 22
3.3 Estudos Moleculares 25
3.3.1 Extração de DNA e RNA 25
3.3.2 Sequenciamento automático pelo método Sanger 26
3.3.3 Sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE) 29
3.3.4 Análise de bioinformática 31
3.3.5 Seleção das variantes de interesse 36
3.3.6 Avaliação das métricas do exoma 38
3.4 Análise Estatística 38

4 RESULTADOS 40
4.1 Estudo Molecular dos Aldosteronomas 41
4.2.1 Correlação das variantes patogênicas no *KCNJ5* com parâmetros clínicos e bioquímicos 44
4.2.2 Fatores preditores de remissão da HAS 45
4.2.2.1 Achados da análise do exoma 46
4.2.2.2 Análise das variantes germinativas selecionadas 49

5 DISCUSSÃO 54

6 CONCLUSÕES 65

7 ANEXOS 67

8 REFERÊNCIAS 87

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

A - Aldosterona

AA - Aminoácido

ABraOM - Arquivo Brasileiro Online de Mutações

ACTH - Hormônio adrenocorticotrópico

AP - Exame anatomopatológico

APCC - Aglomerado de células produtoras de aldosterona

APR - Atividade plasmática de renina

ATP13A3 - Gene que codifica a proteína ATPase 13A3

ATP1A1 - Gene que codifica a subunidade α1 do canal Na^+/K^+-ATPase

ATP2B3 - Gene que codifica o canal Ca^{2+}-ATPase

AVC - Acidente vascular cerebral

Ca^{2+} - Cálcio

CACNA1D - Gene que codifica a subunidade α 1D do canal de cálcio $Ca_v1.3$

CACNA1H - Gene que codifica a subunidade α 1H do canal de cálcio $Ca_v3.2$

CACNA1I - Gene que codifica a subunidade α 1I do canal de cálcio $Ca_v3.3$

CAPPesq - Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

cDNA - Fita complementar de DNA

Cl^- - Cloro

CLCN2 - Gene que codifica o canal de cloro CLC-2

CNV - *Copy-number variation* (variação do número de cópias)

CTNNB1 - Gene que codifica a proteína β-catenina

CVS - Cateterismo das veias suprarrenais

CYP11B1 - Gene que codifica a enzima 11-β-hidroxilase tipo 1

CYP11B1/B2 - Gene quimérico formado pela região promotora do gene *CYP11B1* e região codificadora do gene *CYP11B2*

CYP11B2 - Gene que codifica a enzima aldosterona sintase

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ENSAT - Rede europeia para estudo dos tumores corticais adrenais

ExAC - *Exome Aggregation Consortium*

GnomAD - *Genome Aggregation Database*

GnRH	- Hormônio liberador de gonadotrofinas
GTEx	- *Genotype-Tissue Expression*
HAS	- Hipertensão arterial sistêmica
hCG	- Hormônio gonadotrófico
HE	- Hipertensão arterial sistêmica essencial
HF	- Hiperaldosteronismo familial
HP	- Hiperaldosteronismo primário
IMC	- Índice de massa corporal
K^+	- Potássio
KCNC4	- Gene que codifica o canal de potássio $K_v3.4$
KCNJ5	- Gene que codifica o canal de potássio GIRK 4
LH	- Hormônio luteinizante
LOH	- *Loss of heterozygosity* (perda de heterozigosidade)
MAF	- *Minor Allele Frequency* (frequência alélica mínima)
Na^+	- Sódio
OMIM	- *Online Mendelian Inheritance in Man*
PA	- Pressão arterial
PCR	- Reação em cadeia de polimerase
R	- Concentração de renina direta
SELA	- Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala da FMUSP
SPLE	- Sequenciamento paralelo em larga escala
TC	- Tomografia computadorizada
VCF	- *Variant Call Format*
VCI	- Veia cava inferior
VSD	- Veia suprarrenal direita
VSE	- Veia suprarrenal esquerda
WT	- *Wild type*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Risco de complicações cardiovasculares no hiperaldosteronismo primário (HP) em relação a hipertensão arterial sistêmica essencial (HE) 3

Tabela 2 - Frequência dos subtipos do hiperaldosteronismo primário 4

Tabela 3 - Genes envolvidos na patogênese de 474 aldosteronomas da ENSAT 16

Tabela 4 - Características clínicas dos 62 pacientes com aldosteronomas 25

Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados para sequenciar as regiões *hot-spot* dos genes *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* e o exon 3 do gene *CTNNB1* 28

Tabela 6 - Frequência das variantes patogênicas somáticas encontradas em 62 aldosteronomas 42

Tabela 7 - Correlação da presença de variante patogênica no *KCNJ5* com parâmetros clínicos e hormonais 44

Tabela 8 - Análise multivariada dos fatores preditores de remissão da HAS após adrenalectomia unilateral em pacientes com HP 46

Tabela 9 - Análise das variantes germinativas selecionadas para segregação familial 47

Tabela 10 - Análise das variantes germinativas em genes codificadores de canais iônicos ou relacionados a hiperplasia adrenal que não foram selecionadas para segregação familial 48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de investigação do HP[17] 6

Figura 2 - A, Célula da zona glomerulosa não estimulada. B, Célula da zona glomerulosa estimulada pela angiotensina II ou pelo aumento da concentração extracelular de potássio (K^+). O estímulo promove o fechamento dos canais de (K^+) com despolarização da membrana, ativação dos canais de cálcio (Ca^{2+}) voltagem-dependentes, aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular e estímulo para síntese de aldosterona 11

Figura 3 - A, Representação esquemática da formação do gene quimérico *CYP11B1/B2* a partir do *crossing-over* desigual entre os genes *CYP11B1* e *CYP11B2*. O gene quimérico é constituído pela região promotora do gene *CYP11B1,* que codifica a enzima 11β-hidroxilase e pela região codificadora do gene *CYP11B2*, que codifica a enzima aldosterona sintase (*CYP11B2*)[34] B, Gel de agarose com produto de reação de PCR longa para amplificação do gene quimérico. HFI, Hiperaldosteronismo familial tipo I..... 12

Figura 4 - Representação esquemática dos canais iônicos presentes na membrana das células da zona glomerulosa. Variantes patogênicas em genes que codificam canais iônicos levam a alteração da atividade dos canais, o que promove despolarização crônica da membrana plasmática, aumento do cálcio (Ca^{2+}) intracelular e estímulo para a secreção autônoma de aldosterona. Variantes patogênicas no gene *KCNJ5* levam a alteração do canal de potássio (K^+) GIRK4, com perda da seletividade do canal ao K^+. Variantes patogênicas no gene *ATP1A1* promovem redução da atividade da bomba Na^+/K^+-ATPase. Variantes patogênicas no gene *ATP2B3* causam redução da atividade do canal Ca^{2+}-ATPase responsável pelo efluxo de Ca^{2+} da célula. Variantes patogênicas no gene *CACNA1D* promovem aumento da atividade do canal de Ca^{2+} voltagem dependente responsável pelo influxo de Ca^{2+} na célula..... 14

Figura 5 - Fotos de dois aldosteronomas corados com Hematoxilina e Eosina. A, Adenoma cortical típico, mostrando uma hiperplasia perinodular leve (20x). B, Lesão nodular dominante com hiperplasia micronodular cortical acentuada (20x) 24

Figura 6 - Processo de filtragem das variantes germinativas identificadas no *Freebayes* que foram anotadas utilizando o ANNOVAR 36

Figura 7 - Processo de filtragem das variantes somáticas identificadas no *Lancet* que foram anotadas utilizando o ANNOVAR.....36

Figura 8 - Gráfico de qualidade das corridas de exoma 38

Figura 9 - Eletroferogramas obtidos por sequenciamento pelo método de Sanger de três aldosteronomas com as variantes patogênicas p.Leu168Arg, p.Gly151Arg e p.Glu145Gln do *KCNJ5*.....42

Figura 10 - Eletroferogramas obtidos por sequenciamento pelo método de Sanger de três aldosteronomas com variantes patogênicas. A, Variante p.Leu104Arg do *ATP1A1*. B, Variante p.Leu425_Val426del do *ATP2B3*. C, Variante p.Ser45Pro do *CTNNB1*.....43

Figura 11 - Eletroferograma obtido pela validação da variante p.Leu276Pro do *CACNA1D* por sequenciamento pelo método de Sanger 43

Figura 12 - A, Heredograma mostrando segregação familial da variante p.Pro559Thr do *CACNA1H*. Preenchimento preto, indivíduo portador de HP. Preenchimento cinza, indivíduo portador de HAS. B, Eletroferograma obtido pela validação da variante por sequenciamento pelo método de Sanger.....50

Figura 13 - A, Heredograma mostrando segregação familial da variante p.Arg178Cys do *CACNA1I*. Preenchimento preto, indivíduo portador de HP. Preenchimento cinza, indivíduos portadores de HAS. B, Eletroferograma obtido pela validação da variante por sequenciamento pelo método de Sanger.....51

Figura 14 - Eletroferograma obtido pela validação da variante p.Glu52Ala do gene *ATP13A3* por sequenciamento pelo método de Sanger.....52

Figura 15 - A, Heredograma mostrando segregação familiar da variante p.Tyr507Ser do *KCNC4*. B, Eletroferograma obtido pela validação da variante p.Tyr507Ser por sequenciamentor pelo método de Sanger.....53

Figura 16 - Representação esquemática da subunidade α1 dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependente do tipo T. A subunidade α1 consiste de quatro repetições homólogas (domínios I – IV), cada uma com seis segmentos transmembrana (S1 – S6) e um loop reentrante extracelular "loop P" entre os segmentos S5 e S6. Os segmentos S4 de cada um dos quatro domínios são ricos em arginina e formam o sensor de voltagem do canal. Os segmentos S5 e S6 e o loop P formam o domínio do poro do canal e compreendem os elementos que regulam a seletividade do canal ao Ca^{2+}. As regiões N e C terminais e as alças citoplasmáticas que conectam os quatro domínios transmembrana (I-II, II-III, III-IV) são importantes para a ligação de proteínas reguladoras do canal 57

RESUMO

Vilela LAP. *Investigação genética dos tumores corticais adrenais produtores de aldosterona* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: O hiperaldosteronismo primário (HP) é a causa mais comum de hipertensão arterial sistêmica (HAS) secundária, com prevalência de até 21% em pacientes com HAS resistente. Na última década, foram feitos consideráveis avanços na compreensão da patogênese do HP. Variantes patogênicas somáticas nos genes de canais iônicos *KCNJ5*, *CACNA1D*, *ATP1A1* e *ATP2B3*, envolvidos na manutenção da homeostase iônica intracelular, foram descritas em 38%, 9,3%, 5,3% e 1,7% dos tumores, respectivamente. Variantes patogênicas somáticas no gene *CTNNB1*, fundamental para o desenvolvimento do córtex da suprarrenal, foram também identificadas em aproximadamente 5% dos aldosteronomas. Mais recentemente, uma variante germinativa no gene *CACNA1H*, que codifica a subunidade α1H do canal de cálcio Ca_v 3.2, foi identificada em um paciente com aldosteronoma. **Objetivos**: O objetivo geral desse projeto foi investigar as bases genéticas do HP causado por aldosteronoma. Os objetivos específicos foram: 1) Investigar variantes patogênicas somáticas nos genes *KCNJ5, ATP1A1, ATP2B3 e CTNNB1* em aldosteronomas de indivíduos com HP; 2) Sequenciar o exoma (pareado sangue e tumor) dos casos de HP causados por aldosteronoma, negativos para variantes nos genes citados acima; 3) Correlacionar o genótipo com os parâmetros clínicos e hormonais dos pacientes com aldosteronomas. **Métodos**: As regiões *hot-spot* dos genes *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* e *CTNNB1* foram sequenciadas por Sanger em 62 tumores [56% mulheres; mediana de idade ao diagnóstico 50 anos (variação, 20 a 68)]. Pacientes sem variantes patogênicas somáticas nos genes descritos acima foram submetidos a genotipagem do exoma (pareado sangue e tecido) por sequenciamento paralelo em larga escala (HiSeq 2500, *Illumina*). Variantes germinativas raras (MAF< 0,01% no 1000 genomes, ExAC, gnomAD e AbraOM) em genes codificadores de canais iônicos ou associados a hiperplasia adrenal foram selecionadas para segregação familial. **Resultados**: Variantes patogênicas somáticas em heterozigose foram encontradas em 34 de 62 (54,8%) aldosteronomas. As variantes identificadas nos genes *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* e *CTNNB1* eram previamente conhecidas. Variantes patogênicas no *KCNJ5* foram detectadas em 28 de 62 (45,2%) aldosteronomas. Duas variantes recorrentes foram encontradas: p.Gly151Arg em 13 de 28 (46%) e p.Leu168Arg em 14 de 28 (50%) tumores. A variante patogênica p.Glu145Gln do *KCNJ5* foi identificada em um (4%) aldosteronoma. Adicionalmente, a variante patogênica p.Leu104Arg do *ATP1A1* foi detectada em 2 (3,2%) aldosteronomas; a variante patogênica p.Leu425_Val426del do *ATP2B3* em um (1,6%) caso e a variante patogênica p.Ser45Pro do *CTNNB1* em 2 (3,2%) aldosteronomas. Uma nova variante p.Leu276Pro somática em heterozigose no

CACNA1D foi identificada em um aldosteronoma no exoma e classificada como provavelmente patogênica. Aldosteronomas com variantes patogênicas no *KCNJ5* foram diagnosticados mais frequentemente em mulheres (p= 0,047) e em idades mais jovens (p= 0,002) quando comparado com tumores sem variantes no *KCNJ5*. O tamanho do nódulo foi maior em aldosteronomas com variantes patogênicas no *KCNJ5* (p= 0,0001). O percentual de pacientes com tempo de HAS <5 anos foi similar nos dois grupos. A remissão pós-operatória da HAS foi observada em 50% dos pacientes com tumor contendo variante patogênica no *KCNJ5*, enquanto apenas 15% dos pacientes com tumor sem variante no *KCNJ5* tiveram remissão da HAS (p= 0,003). Na análise multivariada, somente a presença de variante patogênica somática no *KCNJ5* foi um preditor independente de remissão da HAS (p= 0,03). Após filtragem das variantes encontradas no sequenciamento exômico, quatro variantes germinativas *missense* em heterozigose foram consideradas deletérias em mais de 3 algoritmos de predição *in silico*: 1) uma nova variante (p.Pro559Thr) no gene *CACNA1H*, já associado ao fenótipo de HP; 2) a variante p.Arg178Cys no gene *CACNA1I*, que codifica a subunidade α 1I do canal Ca_v 3.3; 3) a variante p.Glu52Ala no gene *ATP13A3,* que codifica uma proteína transmembrana da família de proteínas ATPase do tipo P; 4) a variante p.Tyr507Ser no gene *KCNC4*, que codifica o canal de potássio K_v 3.4. **Conclusão**: Foi caracterizado o espectro de variantes patogênicas somáticas em uma coorte brasileira de tumores corticais adrenais produtores de aldosterona, bem como o impacto das variantes no *KCNJ5* na predição de remissão da HAS após adrenalectomia. Além disso, foram identificados novos genes candidatos provavelmente relacionados a patogênese do HP causado por aldosteronomas.

Descritores: hipertensão; aldosterona; hiperaldosteronismo; adenoma adrenocortical; mutação; canais iônicos

ABSTRACT

Vilela LAP. *Genetic investigation of aldosterone-producing adrenocortical tumors* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Introduction: Primary aldosteronism (PA) is the most common form of secondary hypertension (HT), with a prevalence of approximately 20% in patients with resistant hypertension. In the last decade, somatic mutations in *KCNJ5*, *CACNA1D, ATP1A1* and *ATP2B3* genes, which are involved in maintaining intracellular ionic homeostasis and cell membrane potential, were described in 38%, 9.3%, 5.3% and 1.7% of aldosterone-producing adenomas (APAs), respectively. All these mutations lead to the activation of calcium signaling, the major trigger for aldosterone production. Additionally, somatic activating mutations in exon 3 of *CTNNB1* gene, which is involved in the adrenocortical development, were identified in approximately 5% of APAs. More recently, the germline p.V1951G *CACNA1H* variant was described in a PA patient with an APA. **Aims**: To investigate the genetics of APAs. The specific aims of this study were: 1) To investigate somatic variants in *KCNJ5, ATP1A1, ATP2B3* and *CTNNB1* genes in APAs from PA patients; 2) To perform exome sequencing of PA patients caused by APAs without mutations in those genes already associated with PA; 3) To correlate genetic findings and clinical parameters. **Methods**: *Hot-spot* regions of *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* e *CTNNB1* genes were sequenced by Sanger in 62 APAs [56% women; median of age at diagnosis 50 yrs (range, 20 to 68)]. We performed whole exome sequencing (HiSeq 2500, *Illumina*) in paired blood and tumor DNA samples from 10 unrelated subjects with PA caused by APAs without somatic mutations in *hot-spot* regions of *KCNJ5, ATP1A1*, *ATP2B3* and *CTNNB1.*We searched for rare germline coding variants (MAF <0.01% in 1000 genomes, ExAC, gnomAD and AbraOM) in ion-channel genes, which are expressed in normal adrenal tissue, or in genes previously related to adrenal hyperplasia. **Results**: Pathogenic somatic heterozygous variants were identified in 34 out of 62 (54.8%) APAs. *KCNJ5* pathogenic variants were detected in 28 out of 62 (45.2%) APAs. Two recurrent variants were found in *KCNJ5*: the p.Gly151Arg in 13 out of 28 (46%) and the p.Leu168Arg in 14 out of 28 (50%) APAs. *KCNJ5* pathogenic variant p.Glu145Gln was identified in one (4%) APA. In addition, the p.Leu104Arg *ATP1A1* mutation was detected in two APAs (3.2%); the p.Leu425_Val426del *ATP2B3* mutation in one APA (1.6%); and the p.Ser45Pro *CTNNB1* mutation in two APAs (3.2%). The novel *CACNA1D* somatic heterozygous variant p.Leu276Pro (likely pathogenic) was identified by exome sequencing in one APA. APAs with *KCNJ5* pathogenic variants were diagnosed more often in women (p= 0.047) and at younger ages (p= 0.002) when compared to APAs without *KCNJ5* variants. Nodule size was larger in APAs with *KCNJ5* pathogenic variants (p= 0.0001). The frequency of PA patients com HT duration <5 yrs was similar in both groups. HT remission was observed in 50% of patients with APAs harboring *KCNJ5* pathogenic variants, whereas only 15% of patients with APAs without *KCNJ5* pathogenic variants had HT remission (p=

0.003). In multivariate analysis, only the presence of a *KCNJ5* pathogenic variant was an independent predictor of HT remission (p= 0.03). After exome sequencing analysis, four germline missense heterozygous variants predicted to be pathogenic in ≥3 in silico tools were selected: 1) the novel p.Pro559Thr variant in *CACNA1H* gene, previously associated with PA phenotype; 2) the p.Arg178Cys variant in *CACNA1I* gene, which encodes the α 1I subunit of Ca_v 3.3 channel; 3) the p.Glu52Ala variant in *ATP13A3* gene, which is a member of the P-type ATPase family of membrane transport proteins; and 4) the p.Tyr507Ser variant in *KCNC4* gene, which encodes the voltage-gated potassium channel K_v 3.4. **Conclusion**: We have characterized the spectrum of somatic pathogenic variants in a Brazilian cohort of APAs, and evaluated the impact of *KCNJ5* somatic pathogenic variants in predicting HT remission after adrenalectomy. In addition, we identified potential novel gene candidates in the pathogenesis of PA caused by APAs.

Descriptors: hypertension; aldosterone; hyperaldosteronism; adrenocortical adenoma; mutation; ion channels

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hiperaldosteronismo Primário

O hiperaldosteronismo primário (HP) é a forma mais frequente de hipertensão arterial sistêmica (HAS) secundária com uma prevalência estimada de 4% em hipertensos atendidos em serviços de atenção primária e de 10% em serviços terciários[1,2]. A prevalência do HP em pacientes com HAS resistente varia de 14% a 21%[3,4]. A HAS resistente é definida como a ausência de controle pressórico apesar do uso de três ou mais anti-hipertensivos (sendo um deles preferencialmente diurético) em doses máximas toleradas ou um bom controle pressórico em uso de quatro ou mais medicamentos[5].

O HP é caracterizado pela produção autônoma de aldosterona, que é inadequadamente elevada para a natremia e não é regulada pela angiotensina II e pela calemia. Essa produção autônoma de aldosterona provoca retenção de sódio, supressão da renina plasmática, HAS, lesão cardiovascular e aumento da excreção de potássio, levando a graus variáveis de hipocalemia[6]. O excesso de aldosterona exerce efeitos cardiovasculares que são independentes dos níveis pressóricos, conferindo maior morbimortalidade aos pacientes com HP quando comparado com os pacientes com HAS essencial, pareados por idade, gênero e a mesma intensidade de elevação da pressão arterial (PA)[7,8] (Tabela 1).

Tabela 1 - Risco de complicações cardiovasculares no hiperaldosteronismo primário (HP) em relação a hipertensão arterial sistêmica essencial (HE)[9]

	Risco relativo	Intervalo de confiança 95%
Fibrilação atrial	3,52	2,06-5,99
Doença arterial coronariana	1,77	1,10-2,83
Insuficiência cardíaca congestiva	2,05	1,11-3,78
Acidente vascular cerebral	2,58	1,93-3,45

As principais etiologias do HP são os adenomas corticais adrenais produtores de aldosterona (aldosteronomas) e a hiperplasia cortical adrenal bilateral (hiperaldosteronismo idiopático). Os aldosteronomas são tumores benignos originários da zona glomerulosa medindo usualmente entre 1 cm e 3 cm, mas podem ter menos de 1 cm e não serem visualizados na tomografia computadorizada (TC). Em geral, os aldosteronomas representam cerca de 40% a 50% dos casos de HP[10,11]. O aldosteronoma é classicamente descrito como um nódulo único e bem delimitado constituído por células claras de conteúdo lipídico, morfologicamente semelhantes às células da zona fasciculada, ou por células compactas, semelhantes às células da zona glomerulosa, ou ainda por uma mistura de ambos os tipos. Além da lesão nodular, a glândula suprarrenal adjacente apresenta vários padrões de hiperplasia macronodular ou micronodular[12-14]. O hiperaldosteronismo idiopático é causado por hiperplasia bilateral da zona glomerulosa e constitui 50% a 60% dos casos de HP. Na TC das glândulas suprarrenais, a hiperplasia bilateral é caracterizada por glândulas suprarrenais normais, espessamento bilateral ou alterações assimétricas (nódulo e espessamento). O carcinoma cortical adrenal é uma causa rara de HP e deve ser suspeitado em pacientes com HP e nódulo maior que 4 cm[10,11]. A hiperplasia cortical adrenal unilateral e as formas familiais de HP correspondem a menos que 1% das

causas de HP (Tabela 2). A frequência dos subtipos de HP em diferentes coortes é variável, dependendo da rotina de rastreamento entre os hipertensos e da disponiblilidade do cateterismo das veias suprarrenais (CVS)[6].

Tabela 2 - Frequência dos subtipos do hiperaldosteronismo primário

Etiologia	Frequência
Hiperaldosteronismo idiopático (hiperplasia cortical bilateral)	60%
Adenoma produtor de aldosterona (aldosteronoma)	40%
Hiperplasia cortical adrenal unilateral	< 1%
Carcinoma cortical adrenal	< 1%
Hiperaldosteronismo familial HF Tipo I (Hiperaldosteronismo supressível por glicocorticoide) HF Tipo II (variante patogênica germinativa no *CLCN2*) HF Tipo III (variante patogênica germinativa no KCNJ5) HF Tipo IV (variante patogênica germinativa no *CACNA1H*)	< 1%

HF: Hiperaldosteronismo familial.

A investigação de HP é recomendada nas condições listadas no Quadro 1, conforme descrito no consenso para diagnóstico e tratamento do HP da Sociedade Americana de Endocrinologia (*The Endocrine Society*)[6].

Quadro 1 - Recomendações para investigação do hiperaldosteronismo primário

Recomendações
HAS e hipocalemia espontânea ou induzida por diurético
HAS e incidentaloma adrenal
PA acima de 150/100 mmHg em três medidas obtidas em dias diferentes
HAS (PA ≥ 140/90 mmHg) não controlada com três ou mais drogas anti-hipertensivas, preferencialmente incluindo um diurético (HAS resistente)
PA controlada (< 140/90 mmHg) com quatro ou mais drogas anti-hipertensivas (HAS resistente)
HAS e apneia obstrutiva do sono
HAS e história familial de HAS ou acidente cerebrovascular em idade precoce (< 40 anos)
HAS em parentes de primeiro grau de pacientes com HP

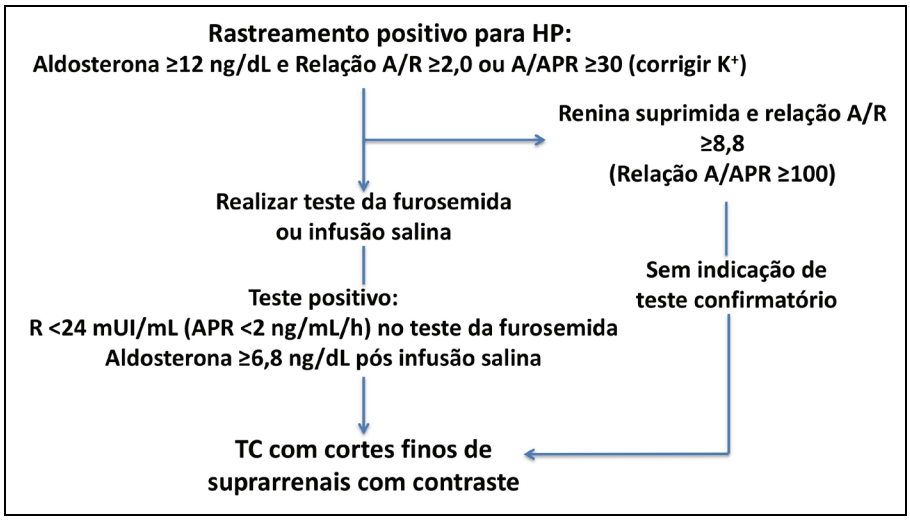
HAS: hipertensão arterial sistêmica; HP: hiperaldosteronismo primário PA: pressão arterial.

1.1.1 Triagem e confirmação diagnóstica

A relação da aldosterona sérica com a renina plasmática é o teste mais sensível para triagem do HP. A mensuração da renina pode ser feita por meio da determinação da atividade plasmática de renina (APR) ou da concentração de renina direta (R)[15]. Atualmente, a maioria dos ensaios comerciais mede a concentração direta de renina. No entanto, os pontos de corte para triagem do HP foram determinados empregando-se a relação aldosterona/APR (A/APR).

Quando se mede a aldosterona plasmática em ng/dL e a APR em ng/mL/h, o ponto de corte da relação A/APR mais comumente adotado é 30[6]. Na presença de níveis baixos de renina, a relação A/APR ou A/R pode estar elevada mesmo quando a aldosterona não está aumentada. Portanto, um valor de aldosterona ≥ 15 ng/dL foi incluído nos critérios de triagem para excluir os indivíduos com hipertensão arterial sistêmica essencial (HE) com renina suprimida e sem HP. Na Instituição onde foi realizado este estudo, 6% dos pacientes com HP apresentaram níveis de aldosterona entre 12 ng/dL e 15 ng/dL. Desta forma, usou-se um valor de aldosterona ≥ 12 ng/dL para prosseguir com a investigação do HP (Figura 1). Atualmente, o método de dosagem mais empregado internacionalmente para a dosagem da aldosterona e renina é o ensaio de quimioluminescência automatizado LIAISON® (*DiaSorin, Salugia, Itália*). Com a determinação da renina por esse ensaio, pode-se usar o fator de 12 para conversão da renina em APR (R/12= APR)[6]. Um estudo recente validou este ensaio de aldosterona e renina na triagem do HP. A relação A/R de 2,0 teve uma sensibilidade de 92%, espeficificidade de 91,8% e um valor preditivo negativo de 98,8%. Utilizando a concentração direta de renina para cálculo direto da relação, uma relação A/R entre 2 e 3 parece ser equivalente a relação A/APR de 30[16].

No Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), segue-se o algoritmo de detecção e confirmação do HP da Figura 1[17]. Na investigação inicial, os níveis de potássio devem estar normais para a relação A/APR ou A/R ser interpretada adequadamente. Se um paciente tem aldosterona ≥ 12 ng/dL e relação A/APR ≥ 30 ou relação A/R ≥ 2,0, o rastreamento do HP é considerado positivo.



A: aldosterona; R: concentração de renina direta; APR: atividade plasmática de renina; TC: tomografia computadorizada

Figura 1 - Fluxograma de investigação do HP[17]

Existem vários testes confirmatórios disponíveis e o consenso da *Endocrine Society* não identifica um teste confirmatório como "padrão-ouro" para o diagnóstico do HP[6]. Os centros especializados escolhem o teste confirmatório de acordo com a sua própria experiência. Na presente coorte, o teste da furosemida tem uma acurácia de 100% para o diagnóstico do HP e não apresenta contraindicação em pacientes com HAS não controlada e hipervolemia. Se o teste da furosemida não for conclusivo e o paciente não tiver contraindicação para sobrecarga de sódio, o teste da infusão salina é realizado. Os testes confirmatórios, bem como toda a abordagem para o diagnóstico do HP estão descritos de forma detalhada no artigo de revisão do Anexo 1[17].

1.1.2 Determinação da etiologia

Todos os pacientes com HP devem ser submetidos a TC de suprarrenal para determinar a etiologia e excluir carcinoma cortical adrenal[6]. A acurácia da TC de suprarrenal para o diagnóstico de aldosteronomas é limitada. A TC pode revelar glândulas suprarrenais normais, mas o paciente pode ter um aldosteronoma pequeno não identificado na imagem. Além disso, os incidentalomas corticais adrenais unilaterais são frequentes, especialmente em indivíduos com mais de 40 anos[18]. Nesse cenário, anormalidades bilaterais na TC podem representar hiperplasia bilateral ou a associação de aldosteronoma e incidentaloma não funcionante contralateral. Recomenda-se que a TC seja realizada com cortes finos e contraste para avaliação da anatomia das veias suprarrenais, em virtude da possibilidade de indicação de CVS (Figura 1).

O consenso para diagnóstico e tratamento do HP da Sociedade Americana de Endocrinologia recomenda que não há indicação de CVS em pacientes jovens (< 35 anos) com hipocalemia espontânea, elevação importante de aldosterona e lesões adrenais unilaterais com características radiológicas consistentes com adenoma cortical na TC[6]. Nesta situação, a probabilidade de um incidentaloma cortical adrenal é muito baixa. Na Instituição onde foi realizada a pesquisa, não se considera a idade de diagnóstico do HP para indicar o CVS, mas a idade do diagnóstico da HAS, já que o tempo médio de HAS antes do diagnóstico de HP é muito longo (aproximadamente 15 anos). Desta forma, recomenda-se a realização do CVS nas seguintes situações: a) TC de suprarrenal normal; b) TC de suprarrenal com espessamento ou nódulos bilaterais; c) Se lesão adrenal unilateral em pacientes com diagnóstico da HAS após 40 anos em virtude da maior prevalência de incidentaloma cortical adrenal nesta faixa etária. O CVS é realizado conforme o protocolo descrito no Anexo 2.

Em pacientes com diagnóstico de HAS antes dos 20 anos e naqueles que têm antecedentes familiais de HP ou AVC hemorrágico antes de 40 anos, deve ser investigado HP familial. A investigação genética deve ser feita inicialmente para o HP familial tipo I (hiperaldosteronismo supressível por glicocorticoides) e tipo III (causado por variantes germinativas no gene *KCNJ5*)[6].

1.1.3 Tratamento

Tanto a adrenalectomia unilateral como o tratamento medicamentoso estão associados à redução da morbidade cardiovascular causada pelo excesso de aldosterona[19]. A redução global da massa ventricular esquerda demonstrou ser semelhante nos pacientes tratados com adrenalectomia unilateral ou com antagonista de mineralocorticoide após 6 anos de seguimento[20].

A adrenalectomia unilateral laparoscópica é indicada para pacientes com produção unilateral de aldosterona (aldosteronoma ou hiperplasia unilateral). Antes da adrenalectomia unilateral, os pacientes devem ser tratados com antagonista de mineralocorticoide para normalizar os níveis de potássio e renina, e evitar o hipoaldosteronismo hiporreninêmico no pós-operatório. No pós-operatório precoce, evidencia-se normalização da aldosterona e do potássio sérico, além do desbloqueio da renina em graus variáveis.

Após adrenalectomia unilateral, a confirmação da produção unilateral de aldosterona é feita pela detecção de um adenoma ou hiperplasia difusa na avaliação anatomopatológica associado com a cura bioquímica do HP. A cura bioquímica do HP acarreta uma melhora clínica significativa no controle pressórico, mas o sucesso clínico completo (definido como a PA < 140x90 mmHg sem uso de medicações anti-

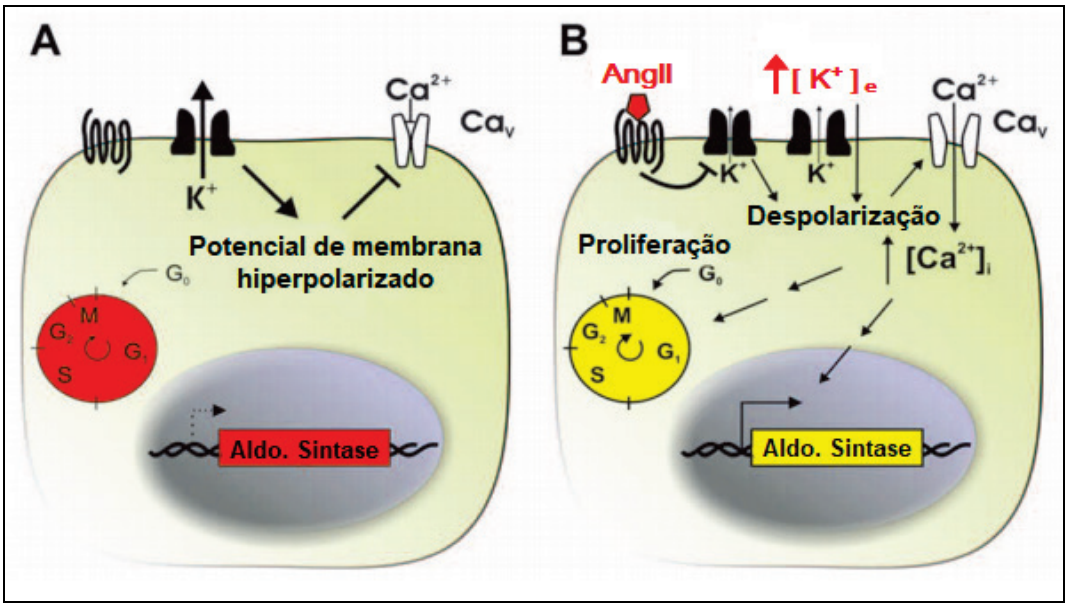
hipertensivas) é observado em cerca de 50% (variação de 35% a 80%) dos pacientes[6]. Os principais fatores preditores da persistência da HAS no pós-operatório são história familial de HE e um longo período de HAS antes do diagnóstico de HP[21,22].

O HP causado por produção bilateral de aldosterona deve ser tratado com um antagonista de mineralocorticoide (espironolactona ou eplerenona). A espironolactona (50 mg/d - 400 mg/d) é a única medicação disponível no Brasil para o tratamento clínico do HP, que tem como objetivo controlar a PA, normalizar potássio e desbloquear renina[23]. Como a espironolactona é também um antagonista do receptor androgênico e inibe a síntese de andrógeno, o seu uso está associado a ginecomastia e redução da libido nos homens[24]. Em pacientes com doença renal crônica em estadio 3 ou em pacientes idosos, o antagonista de mineralocorticoide deve ser administrado com precaução devido ao risco de hipercalemia e piora da função renal. O eplerenona é um antagonista de mineralocorticoide seletivo sem efeitos antiandrogênicos e, portanto, menos associado aos efeitos adversos descritos acima. A dose inicial do eplerenona é 25 mg duas vezes ao dia (podendo atingir 50 mg 2x/dia)[25]. Um metanálise recente demonstrou que a redução da incidência cumulativa de eventos cardiovasculares estava associada a um desbloqueio da renina pela espironolactona (APR > 1 ng/mL/h)[26].

1.2 Aspectos Genéticos do HP

Nos últimos anos, foram feitos consideráveis avanços na compreensão da genética molecular relacionada ao desenvolvimento do HP por meio da identificação de defeitos genéticos em canais iônicos que controlam o potencial de despolarização da membrana plasmática das células da zona glomerulosa e, consequentemente, a secreção de aldosterona[27].

A produção de aldosterona na zona glomerulosa do córtex suprarrenal é rigorosamente regulada para manter a homeostase eletrolítica renal. A ativação da via de sinalização dependente de cálcio (Ca^{2+}) tem um papel central na regulação da produção de aldosterona, especificamente aumentando a expressão do gene *CYP11B2*. As células da zona glomerulosa apresentam uma alta condutância de potássio (K^+) em repouso, o que produz um potencial de membrana altamente negativo. A despolarização destas células tanto por aumento da concentração extracelular de K^+ quanto pelo fechamento dos canais de K^+ pela angiotensina II promove a ativação dos canais de cálcio voltagem-dependentes e aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular, com consequente estímulo para síntese de aldosterona (Figura 2)[27,28].



[Fonte: Adaptado de Choi *et al.*[29]]

Figura 2 - A, Célula da zona glomerulosa não estimulada. B, Célula da zona glomerulosa estimulada pela angiotensina II ou pelo aumento da concentração extracelular de potássio (K^+). O estímulo promove o fechamento dos canais de (K^+) com despolarização da membrana, ativação dos canais de cálcio (Ca^{2+}) voltagem-dependentes, aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular e estímulo para síntese de aldosterona

1.2.1 HP familial

Quatro subtipos de HP familial foram descritos até o momento[30,31]. O HP familial tipo I ou HP supressível por glicocorticoide foi reportado incialmente em 1966, mas somente em 1992 foi identificada a sua etiologia: um gene quimérico constituído pela região promotora da 11β-hidroxilase (*CYP11B1*) e pela região codificadora da aldosterona sintase (*CYP11B2*), formado em decorrência de um emparelhamento desigual durante o *crossing-over*[32,33]. Como consequência, a síntese de aldosterona passa a ser regulada pelo ACTH e não pela angiotensina II. A apresentação clínica típica é HAS resistente em indivíduos com menos de 20 anos e história familial de HAS. Os pacientes com HP familial tipo I apresentam níveis de aldosterona suprimidos (< 4 ng/dL) após um teste de supressão prolongado com

dexametasona (0,5 mg a cada 6 horas durante 48 ou 72 horas), mas o diagnóstico definitivo é feito pela identificação do gene quimérico em gel de agarose em uma reação de PCR longa[34] (Figura 3). O HP familial tipo I é tratado com dexametasona em adultos (0,125 mg/d - 0,25 mg/d), associado ou não a doses baixas de espironolactona[35,36].

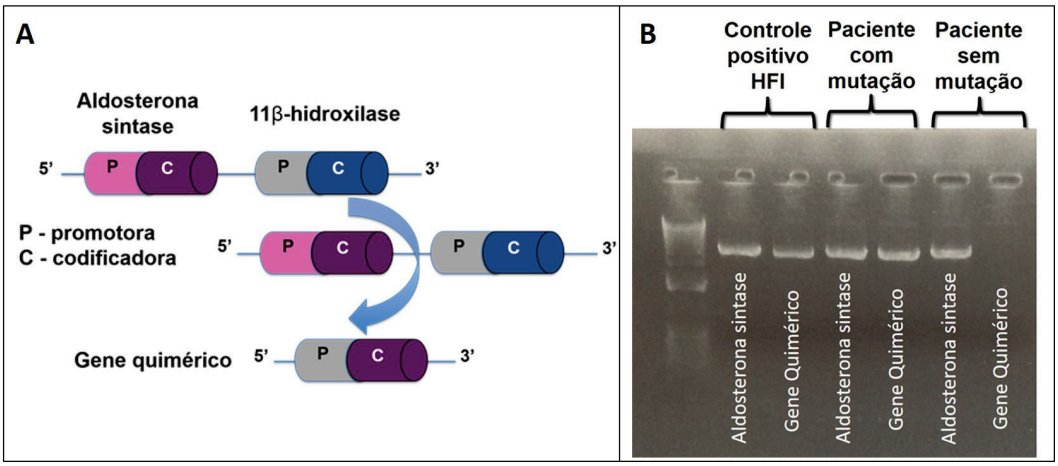
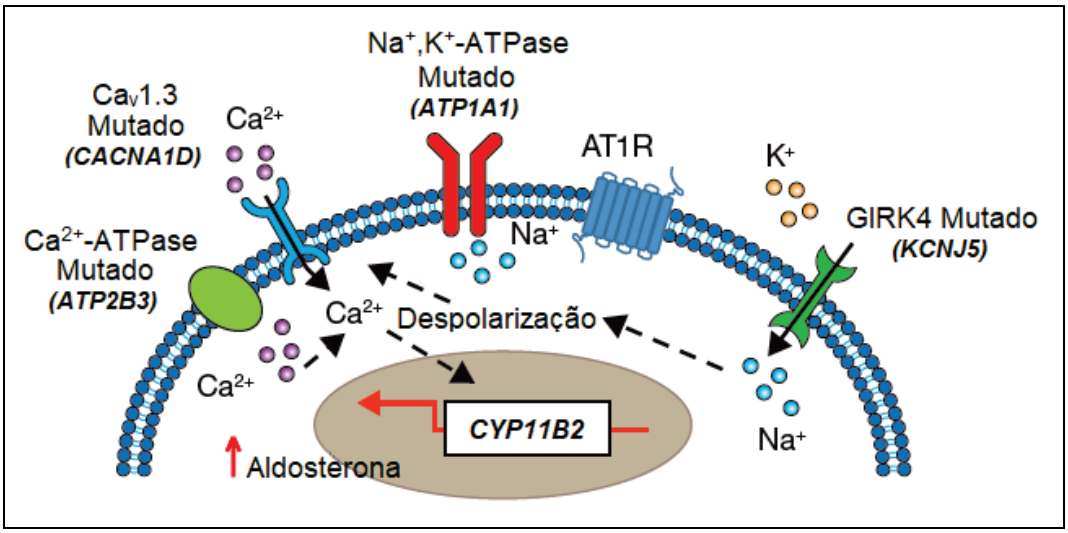


Figura 3 - A, Representação esquemática da formação do gene quimérico *CYP11B1/B2* a partir do *crossing-over* desigual entre os genes *CYP11B1* e *CYP11B2*. O gene quimérico é constituído pela região promotora do gene *CYP11B1*, que codifica a enzima 11β-hidroxilase e pela região codificadora do gene *CYP11B2*, que codifica a enzima aldosterona sintase (*CYP11B2*)[34] B, Gel de agarose com produto de reação de PCR longa para amplificação do gene quimérico. HFI, Hiperaldosteronismo familial tipo I

O HP familial tipo II é clinicamente e bioquimicamente indistinguível das formas esporádicas. A prevalência descrita foi 6% em uma grande coorte de HP[30]. O HP familial tipo II é diagnosticado quando pelo menos dois membros de primeiro grau da mesma família têm HP confirmado (aldosteronoma ou hiperplasia cortical bilateral). A base molecular do HP familial tipo II ainda é pouco conhecida. Estudos de ligação demonstraram uma associação com o loci 7p22[37]. Recentemente, variantes germinativas em heterozigose no gene *CLCN2* foram identificadas em algumas famílias com HP familial tipo II de início precoce[31]. O *CLCN2* codifica o canal de

cloro (Cl^-) CLC-2 e é expresso na zona glomerulosa da suprarrenal. As variantes descritas do *CLCN2* (p.Arg172Gln, p.Met22Lys, p.Tyr26Asn, p.Ser865Arg, p.Lys362del e p.Gly24Asp) promovem um aumento da condutância de Cl^- pelo canal, resultando em despolarização da membrana plasmática, aumento da expressão de *CYP11B2* e estímulo contínuo para a síntese de aldosterona. O modo de transmissão é autossômico dominante com penetrância incompleta[31,38].

O HP familial tipo III, descrito inicialmente em 2008, é caracterizado por HAS grave na primeira infância associada à HP, hipocalemia e hiperplasia macronodular bilateral da suprarrenal[39]. Em 2011, a etiologia genética foi determinada por meio da identificação de uma variante germinativa patogênica (p.Thr158Ala) no gene *KCNJ5,* que codifica o canal de potássio GIRK4 (Kir3.4)[29]. Essa variante, localizada no filtro do canal Kir3.4, altera a seletividade pelo K^+, o que resulta em aumento da condutância de sódio (Na^+), despolarização celular contínua e estímulo para a síntese de aldosterona (Figura 4)[40]. Subsequentemente, outras variantes patogênicas com variabilidade fenotípica foram descritas[40-42]. Pacientes portadores das variantes germinativas p.Gly151Arg, p.Thr158Ala e p.Ile157Ser apresentam geralmente um fenótipo grave do HP com HAS de início precoce e resistente ao tratamento medicamentoso com antagonistas de minelarocorticoide e outras drogas anti-hipertensivas. A adrenalectomia bilateral pode ser necessária para controle pressórico adequado nos casos resistentes ao tratamento medicamentoso[34]. Por outro lado, as variantes p.Gly151Glu e p.Tyr152Cys foram associadas a um fenótipo mais leve, com a HAS facilmente controlada e sem evidência de hiperplasia adrenal na TC[28,40].



[Fonte: Adaptado de Zennaro *et al.*[28]]

Figura 4 - Representação esquemática dos canais iônicos presentes na membrana das células da zona glomerulosa. Variantes patogênicas em genes que codificam canais iônicos levam a alteração da atividade dos canais, o que promove despolarização crônica da membrana plasmática, aumento do cálcio (Ca^{2+}) intracelular e estímulo para a secreção autônoma de aldosterona. Variantes patogênicas no gene *KCNJ5* levam a alteração do canal de potássio (K^+) GIRK4, com perda da seletividade do canal ao K^+. Variantes patogênicas no gene *ATP1A1* promovem redução da atividade da bomba Na^+/K^+-ATPase. Variantes patogênicas no gene *ATP2B3* causam redução da atividade do canal Ca^{2+}-ATPase responsável pelo efluxo de Ca^{2+} da célula. Variantes patogênicas no gene *CACNA1D* promovem aumento da atividade do canal de Ca^{2+} voltagem dependente responsável pelo influxo de Ca^{2+} na célula

O HP familial tipo IV é uma forma muito rara causada por variantes germinativas ativadoras no gene *CACNA1H.* Este gene está localizado no cromossomo 16p13 e codifica a subunidade α do canal de cálcio do tipo T, $Ca_v3.2$. Scholl *et al.*[43] identificaram cinco pacientes com HP diagnosticado antes dos 10 anos com a mesma variante (p.Met1549Val) em heterozigose no *CACNA1H*. Essa variante foi herdada em três casos e ocorreu *de novo* em dois pacientes. A caracterização eletrofisiológica *in vitro* revelou que a variante p.Met1549Val promove um aumento do influxo de Ca^{2+} nas células da zona glomerulosa com aumento da produção de aldosterona[44]. Variantes adicionais no *CACNA1H* (p.Met1549Ile, p.Ser196Leu, p.Val1951Glu e p.Pro2083Leu) foram descritas em pacientes com HP familial diagnosticado após os 20 anos e com padrão de penetrância incompleta[45].

1.2.2 Genética dos aldosteronomas

Em 2011, Choi *et al.*[29] identificaram variantes patogênicas somáticas no gene *KCNJ5* em oito de 22 aldosteronomas (36%). As variantes identificadas em aldosteronomas, assim como as variantes germinativas, estão localizadas no filtro de seletividade do canal de K^+ GIRK4 ou nas suas proximidades (exon 2, entre os aminoácidos 122-199) e promovem a perda da seletividade do canal ao K^+, com aumento da condutância ao Na^+ (Figura 4). As variantes patogênicas somáticas mais frequentes são p.Gly151Arg e p.Leu168Arg[28]. Na coorte da Rede Europeia para Estudo dos Tumores Corticais Adrenais (ENSAT) que incluiu 474 aldosteronomas provenientes de nove diferentes centros, variantes patogênicas somáticas no gene *KCNJ5* foram identificadas em 38% dos aldosteronomas (Tabela 3)[46]. As variantes recorrentes p.Gly151Arg (c.451G>A ou c.451G>C) e p.Leu168Arg (c.503T>G) foram identificadas por 63% e 36% dos casos, respectivamente. Adicionalmente, as variantes patogênicas p.Thy158Ala (c.472A>G) e p.Trp126Arg (c.376T>C) também foram identificadas[46]. No Anexo 3, estão listadas as principais variantes patogênicas descritas no *KCNJ5* e demais genes envolvidos na patogênese dos aldosteronomas.

Em 2013, duas variantes patogênicas somáticas inativadoras no gene *ATP1A1*, que codifica a subunidade $\alpha 1$ do canal Na^+/K^+-ATPase, foram identificadas em seis de 19 aldosteronomas (c.311T>G; p.Leu104Arg e c.995T>G; p.Val332Gly)[47,48]. Essas variantes estão localizadas no primeiro e no quarto domínios transmembrana do canal, que são regiões importantes para a ligação do K^+. Estudos funcionais demonstraram uma redução significativa da atividade da bomba Na^+/K^+-ATPase e uma significativa redução da afinidade ao K^+, promovendo a despolarização da membrana plasmática (Figura 4)[47]. Em 474 aldosteronomas da

ENSAT, 25 (5,3%) tumores apresentavam variante patogênica somática no gene *ATP1A1*: a p.Leu104Arg (c.311T>G) em 17 casos; a deleção p.Phe100_Leu104del (c.299_313TCTCAATGTTACTGT) em cinco casos; a p.Gly99Arg (c.295G>A) em um caso; e a p.Val332Gly (c.995T>G) em dois casos (Tabela 3, Anexo 3)[46].

Tabela 3 - Genes envolvidos na patogênese de 474 aldosteronomas da ENSAT[46]

Gene	Proteína	*Loci*	*Hot-spot*	Frequência de Mutações (%)
KCNJ5	GIRK4 (Canal de K^+)	11q24.3	Exon 2	38
CACNA1D	$Ca_v1.3$ (Canal de Ca^{2+})	3p21.1	Não tem	9,3
ATP1A1	Na^+/K^+-ATPase (Bomba ATPase)	1p13.1	Exon 4 e 8	5,3
ATP2B3	Ca^{2+}-ATPase (Bomba ATPase)	Xq28	Exon 8	1,7
CTNNB1	B-catenina	3p22.1	Exon 3	NA
Total				**54**

NA: não avaliado; ENSAT: Rede Europeia para Estudo dos Tumores Corticais Adrenais.

Beuschlein *et al.*[47] descreveram duas deleções *in-frame* (c.1272_1277delGCTGGT e c.1273_1278delCTGGTC) no gene *ATP2B3*, que codifica o canal Ca^{2+}-ATPase, resultando na deleção de dois aminoácidos nas posições 425 e 426 (p.Leu425_Val426del), que são altamente conservados na família das ATPases. A redução da atividade da bomba Ca^{2+}-ATPase (efluxora de cálcio) gera um aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} e consequente estímulo para a produção da aldosterona (Figura 4)[47]. Na coorte da ENSAT, variantes patogênicas somáticas no gene *ATP2B3* foram identificadas em 8 (1,7%) de 474 aldosteronomas:

a deleção p.Leu425_Val426del (c.1272_1277delGCTGGT ou c.1273_1278delCTGGTC) em cinco casos; a deleção p.Val426_Val427del (c.1277_1282TCGTGG) em um caso; e uma variante nova p.Val424_Leu425del (c.1270_1275delGTGCTG) em dois casos (Tabela 3, Anexo 3)[46]. Nenhuma variante patogênica germinativa no *ATP1A1* e *ATP2B3* foi descrita até o momento.

Em 2013, variantes patogênicas somáticas (quatro alterando o resíduo Gly403 e uma alterando a Ile770) no gene *CACNA1D,* que codifica a subunidade α 1D do canal de Ca^{2+} voltagem-dependente $Ca_v1.3$, foram identificadas em 5 (11,6%) de 43 aldosteronomas[49]. Ambas as alterações nos aminoácidos 403 e 770 resultam em ativação do canal de Ca^{2+} em potenciais de despolarização mais baixos, resultando no aumento do seu influxo e consequente aumento da produção de aldosterona (Figura 4)[49]. Além desse relato inicial, variantes patogênicas somáticas no gene *CACNA1D* foram identificadas em 44 (9,3%) de 474 tumores da ENSAT (Tabela 3, Anexo 3)[46]. Ao contrário dos genes *KCNJ5, ATP1A1* e *ATP2B3,* o *CACNA1D* (49 exons) não possui áreas *hot-spot.*

Recentemente, Daniil *et al.*[45] identificaram uma variante patogênica germinativa (c.5852T>A; p.Val1951Glu) no gene *CACNA1H* em um paciente com aldosteronoma (Anexo 3). Os autores afirmam ainda que a variante p.Val1951Glu está localizada no domínio citoplasmático C-terminal do $Ca_v3.2$, em um resíduo conservado e envolvido na ativação rápida do canal. Estudo funcional sugere que a variante p.Val1951Glu promove um ganho de função no canal $Ca_v3.2$.

Além de ter um papel na tumorigênese dos carcinomas corticais adrenais[50], variantes patogênicas somáticas ativadoras do exon 3 da *CTNNB1* foram identificadas em aldosteronomas (Anexo 3)[51,52]. A via Wnt/β-catenina constitui uma

via fundamental no desenvolvimento e manutenção do córtex da suprarrenal, regulando o crescimento celular, motilidade e diferenciação[53]. O exon 3 do gene *CTNNB1* contém resíduos de serina e treonina específicos que, quando fosforilados, direcionam a β-catenina para degradação. As variantes patogênicas que afetam estes aminoácidos impedem a fosforilação da β-catenina, levando ao deslocamento nuclear da β-catenina e consequente ativação dessa via de sinalização[50,54].

Em 2016, variantes patogênicas no *CTNNB1* foram identificadas em três aldosteronomas (c.98C>G; p.Ser33Cys, c.134C>T; p.Ser45Phe e c.100G>A; p.Gly34Arg) diagnosticados em mulheres com HP (duas na gestação e uma após a menopausa)[51]. Esses tumores expressavam altos níveis de receptores gonadais (receptor de LH/hCG e receptor de GnRH), sugerindo que as variantes descritas promovem a desdiferenciação das células corticais adrenais em células precursoras adrenais/gonadais[51]. Adicionalmente, Åkerström *et al.*[52] identificaram três variantes patogênicas somáticas no *CTNNB1* (c.133T>C; p.Ser45Pro, c.134C>T; p.Ser45Phe e c.121A>G; p.Thr41Ala) em 10 (5,1%) de 198 aldosteronomas[52].

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar as bases genéticas do HP causado por aldosteronoma.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar variantes patogênicas somáticas nos genes *KCNJ5, ATP1A1, ATP2B3 e CTNNB1* em aldosteronomas de indivíduos com HP.
- Sequenciar o exoma (pareado sangue e tumor) dos casos de HP causado por aldosteronoma sem variantes patogênicas somáticas nos genes descritos acima.
- Correlacionar o genótipo com os parâmetros clínicos e hormonais dos pacientes com aldosteronomas.

3 MÉTODOS

3.1 Considerações Éticas

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq), da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da FMUSP (46928015.1.0000.0068) (Anexo 4). O termo de consentimento livre e esclarecido por escrito foi assinado por todos os pacientes (Anexo 5). As avaliações hormonais e os estudos moleculares foram realizados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular - LIM 42, Divisão de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da FMUSP. O sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE) e a análise de bioinformática foram realizados no Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (SELA), Rede PREMiUM da FMUSP, financiado pela FAPESP como Equipamentos Multiusuários (14/50137-5).

3.2 Pacientes

Nos últimos 20 anos, 168 pacientes foram diagnosticados com HP no Serviço de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da FMUSP: 119 pacientes com aldosteronoma, 14 com hiperplasia cortical bilateral, nove com hiperplasia unilateral, um com carcinoma cortical produtor de aldosterona, dois com HP familial tipo I e 23 com etiologia indeterminada (pacientes com lesão unilateral sem dados de seguimento ou sem cura após adrenalectomia e pacientes com lesão bilateral/adrenais normais sem CVS).

Neste estudo, foram selecionados 62 pacientes (35 mulheres e 27 homens) com HP causado por aldosteronomas e tratados por adrenalectomia unilateral, com tecido fresco armazenado no nitrogênio líquido (Tabela 4). O diagnóstico de HP foi estabelecido conforme descrito no fluxograma da Figura 1 na maior parte dos casos. Aldosterona sérica e renina plasmáticas (Valor de normalidade, VN: 4,4-46 uUI/mL) foram dosadas pelo kit LIAISON® (*DiaSorin, Salugia, Italy*). Até 2011, o laboratório de hormônios do Hospital das Clínicas da FMUSP utilizava radioimunoensaio para determinar a APR (VN: 1,5-5,7 ng/mL/h).

Todos os pacientes apresentavam produção unilateral de aldosterona, confirmada por CVS ou pela cura bioquímica do HP após adrenalectomia unilateral. A cura bioquímica do HP foi definida pela correção da hipocalemia e normalização da relação A/R ou A/APR. Nos pacientes com persistência da relação A/R elevada no pós-operatório, a supressão da aldosterona ou desbloqueio da renina devem ser avaliados por um teste confirmatório. Se a aldosterona basal estiver abaixo de 10 ng/dL, os testes confirmatórios são desnecessários, mesmo se a relação A/R estiver aumentada[55]. O sucesso clínico completo foi definido como remissão da HAS, ou seja, uma PA < 140x90 mmHg na ausência de qualquer medicação anti-hipertensiva após 6 meses de seguimento. O ponto de corte da PA ≥ 140x90 mmHg é empregado para definir HAS estágio 1 nas diretrizes brasileiras e europeias para o manejo da HAS[56,57]. Os critérios para sucesso bioquímico e clínico após adrenalectomia para HP unilateral foram propostos por um estudo multicêntrico recente (*PASO study - Primary Aldosteronism Surgical Outcome*)[55].

Os blocos de parafina dos pacientes foram selecionados para revisão do diagnóstico anatomopatológico (AP). Cortes representativos foram feitos a partir dos

blocos de parafina e corados com Hematoxilina e Eosina. A revisão das lâminas foi realizada pela patologista Maria Claudia Nogueira Zerbini do Departamento de Anatomia Patológica da FMUSP. Os adenomas foram caraterizados por meio de critérios que indicassem uma proliferação celular de carácter neoplásico benigno: nódulo bem delimitado em relação as áreas hiperplásicas de *background*, uniformidade do tipo celular, alto grau nuclear e baixo índice de mitoses. Após revisão, 42 casos foram classificados como adenomas típicos. Em outros 20 casos, havia uma lesão nodular dominante, que apresentava uma delimitação menos evidente em relação as áreas hiperplásicas adjacentes (Figura 5). Como em ambos os casos, a produção de aldosterona era unilateral e a literatura não faz distinção entre esses dois subtipos, foi utilizado o termo aldosteronoma para definir ambas as lesões descritas acima (adenoma típico e lesão nodular dominante). Nas duas situações, havia hiperplasia de grau moderado a acentuado no restante da glândula suprarrenal em aproximadamente 60% dos casos.

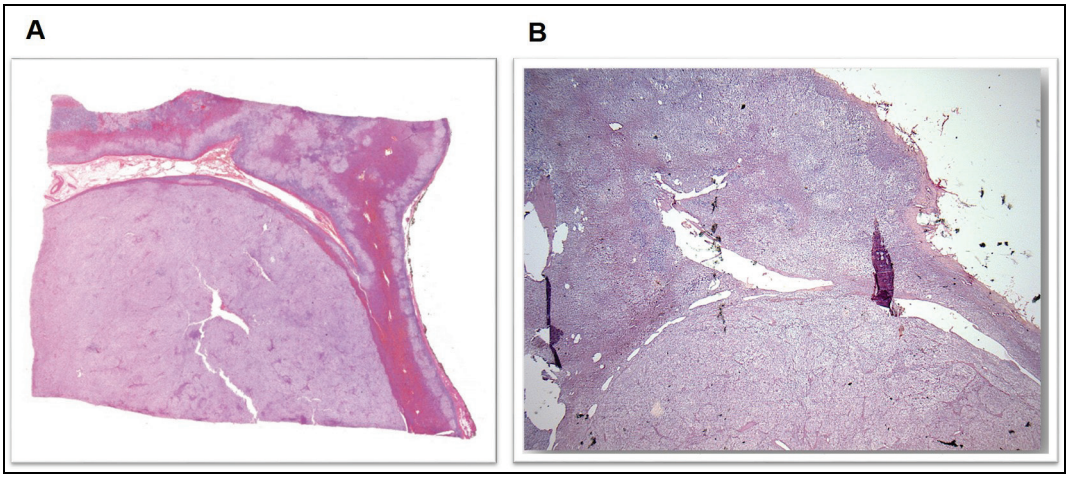


Figura 5 - Fotos de dois aldosteronomas corados com Hematoxilina e Eosina. A, Adenoma cortical típico, mostrando uma hiperplasia perinodular leve (20x). B, Lesão nodular dominante com hiperplasia micronodular cortical acentuada (20x)

Tabela 4 - Características clínicas dos 62 pacientes com aldosteronomas

	Aldosteronomas (n= 62)
Sexo (F:M)	1,3:1
Idade ao diagnóstico (anos)	50 (20-68)
Duração da HAS (anos)	14 (1-55)
Hipocalemia (%)	83
Lesão de órgão alvo (%)	73
Aldosterona (VN: < 10 ng/dL)	28,7 (11,7-195)
APR (VN: 1,5-5,7 ng/mL/h)	0,16 (0,02-1,1)
Renina (VN: 4,4-46 uUI/mL)	1,6 (0,4-8,2)
Relação A/APR	199 (31-1466)
Relação A/R	17,3 (2,9-122)
Tamanho do Nódulo (cm)	1,5 (0,7-4,0)
CVS, n (%)	21 (34)
Sucesso CVS (%)	81
Tempo de seguimento (meses)	26 (6-76)
Cura do HP, n (%)	62 (100)
Remissão da HAS, n (%)	19 (31,1)

As variáveis contínuas estão demonstradas em mediana (variação); A: aldosterona; APR: atividade plasmática de renina; R: renina; CVS: cateterismo das veias suprarrenais; HP: hiperaldosteronismo primário; HAS: hipertensão arterial sistêmica; VN: valor de normalidade.

3.3 Estudos Moleculares

3.3.1 Extração de DNA e RNA

Os tecidos tumorais foram obtidos durante procedimento cirúrgico habitual. Após análise macroscópica, o patologista selecionou as áreas representativas do nódulo. Os fragmentos dos nódulos da suprarrenal foram armazenados em nitrogênio líquido até a realização da extração de DNA e RNA. O DNA e o RNA total das amostras foram extraídos utilizando-se o kit comercial AllPrep DNA/RNA Mini Kit (*Qiagen, Courtaboeuf Cedex, França*). Concomitante com a extração de DNA e RNA, foram realizados cortes do fragmento tumoral em criostato para análise da histopatologia e confirmação da representatividade tumoral. A qualidade do DNA e RNA extraídos foi

avaliada a partir da relação de absorbância $A_{260/280}$ e integridade das bandas de DNA e RNA ribossômico em gel de agarose 1% após eletroforese. A relação de absorbância $A_{260/280}$ foi maior que 1,8 em todas as amostras. As concentrações das amostras de DNA e RNA total foram determinadas por leitura em espectofotômetro (Biophotometer, Eppendorf, Alemanha). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por transcrição reversa utilizando-se o produto comercial *Superscript III FirstStrand S* (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*). As amostras foram armazenadas a -20 ºC.

Amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico ou de células extraídas por *swab* da mucosa oral de indivíduos arrolados na pesquisa. O DNA foi extraído de acordo com procedimento padronizado no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (Anexo 6). A concentração do DNA extraído foi obtida por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm (uma unidade DO 260 = 50 µg/mL). A relação ideal entre as leituras em 260 nm e 280 nm para a caracterização da pureza do material é entre 1,80 e 2,00. As amostras foram mantidas congeladas a 20ºC negativos até seu uso.

3.3.2 Sequenciamento automático pelo método Sanger

Sessenta e dois tumores foram submetidos ao sequenciamento das regiões *hot-spot* dos genes *KCNJ5*, *ATP1A1* e *ATP2B3* e do exon 3 do gene *CTNNB1*. Estudos prévios de sequenciamento exômico dos genes *KCNJ5, ATP1A1* e *ATP2B3* não identificaram variantes fora das regiões que codificam o filtro de seletividade desses canais iônicos[40,47-49]. Apesar das variantes no *CACNA1D* serem mais

frequentes que no *ATP1A1* e *ATP2B3,* o *CACNA1D* possui 48 exons sem áreas *hot-spot*. Dessa forma, a análise do *CACNA1D* foi feita nos tumores submetidos ao sequenciamento exômico.

Os pacientes com tumores que apresentaram variantes patogênicas somáticas nos genes *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* e *CTNNB1* foram submetidos à pesquisa da respectiva variante em leucócitos de sangue periférico. Além do HP familial tipo III, o HP familial tipo I foi excluído em todos os indivíduos incluídos neste estudo.

Em cada reação de PCR para estudo dos genes *KCNJ5, ATP1A1, ATP2B3* e *CTNNB1*, foram amplificados 100 ng a 200 ng de material genético (cDNA tumoral para investigação de variantes somáticas nos genes *KCNJ5, ATP1A1* e *ATP2B3;* DNA genômico tumoral para pesquisa de variantes somáticas no gene *CTNNB1* e DNA genômico de leucócitos periféricos para investigação de variantes germinativas). Todas as reações de PCR foram realizadas utilizando 10 pmol/µL a 15 pmol/µL de cada oligonucleotídeo específico (Tabela 5) e 200 µM de trifosfato de nucleotídeo (dNTP) para um volume final de 25 µL.

A região *hot-spot* do gene *KCNJ5* foi sequenciada utilizando 1 U de Platinum Taq DNA Polimerase High Fidelity (*Invitrogen*), além do tampão [600 mM Tris-SO_4, 180 mM $(NH_4)_2SO_4$] e 50 mM de MgSO4. A temperatura de anelamento utilizada foi de 56°C.

O sequenciamento das regiões *hot-spot* dos genes *ATP1A1*, *ATP2B3* e *CTNNB1* foi realizado utilizando 2,5 U de Taq DNA Polimerase (*Invitrogen*), além do tampão (10 mM Tris-HCL, 1,5 mM MgCl2, 50 mM KCl). A temperatura de anelamento utilizada nas reações de PCR dos genes *ATP1A1* e *ATP2B3* foi de 58°C e do gene *CTNNB1* foi de 54°C.

Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados para sequenciar as regiões *hot-spot* dos genes *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* e o exon 3 do gene *CTNNB1*

Nome	Sequência
cDNA_KCNJ5_F	GGTGACCTGGACCATGTTGGCG
cDNA_KCNJ5_R	CTTGGCAGGTCATGCCTGTGGC
DNA_KCNJ5_F	GTGGCCTTCCATCTTGTGTT
DNA_KCNJ5_R	AGGCACAGACCTGCATCTTC
ATP1A1_exon4_F*	TGCTCGTGCAGCTGAGATCC
ATP1A1_exon4_R*	TTCTGTAGCAGCTTGGATGC
ATP1A1_exon8_F*	CGCACGTGGTATTGTTGTCT
ATP1A1_exon8_R*	CACTGTCATCCGGTTCTGAG
ATP2B3_F*	CGCACCAGGTTGTTGTCTTT
ATP2B3_R*	CGTCATCATCCTGGTCCTCT
CTNNB1_F	TGGGTCATATCACAGATTCTTTTTT
CTNNB1_R	TCAAAACTGCATTCTGACTTTCA

F: *forward*; R, *reverse*.
* Os oligonucleidos para *ATP1A1* e *ATP2B3* localizam-se dentro de um único exon e podem ser utilizados para amplificar DNA e cDNA.

A concentração de cDNA ou DNA dos produtos gerados pela PCR foi estimada pela comparação com fragmentos do marcador de peso molecular de concentração conhecida (ΦX) em gel de agarose. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à purificação enzimática com a combinação das enzimas fosfatase alcalina de camarão (2 U/µl) e exonuclease I (10 U/µl) (*PCR product pre-sequencing kit, Amersham Life Science, Cleveland, OH, EUA*) com incubação a 37ºC por 15 minutos seguido de 80ºC por mais 15 minutos para inativação das enzimas. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit *ABI PrismTMBigDyeTerminator* (*Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA*) e quantidades variáveis de produto de PCR (10 ng a 100 ng) de acordo com o tamanho do fragmento. Os produtos desta reação foram submetidos à eletroforese em sequenciador automático (*ABI PrismGeneticAnalyzer 3100 automatic DNA sequencer*). A leitura dos eletroferogramas foi realizada através do programa *Sequencher 4.10.1* (*GeneCodes Corporation, Ann Arbor*, *EUA*).

3.3.3 Sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE)

A genotipagem do exoma foi realizada em 11 pacientes, de forma pareada em DNA de sangue periférico e tumoral. O SPLE foi realizado no laboratório de Sequenciamento em Larga Escala da FMUSP (SELA) em sequenciadores da plataforma Illumina (*Illumina, Inc, San Diego*, CA, EUA). O sequenciamento envolveu três etapas fundamentais:

a. Confecção de bibliotecas de fragmentos de DNA. A biblioteca para o sequenciamento do exoma dos indivíduos selecionados foi preparada com kits comerciais *SureSelect^{XT} Human All Exon V5+UTRs (Agilent Technologies,* Santa Clara, CA, EUA). Inicialmente, o DNA genômico foi fragmentado por ação mecânica, sendo adicionados os adaptadores (que são sequências complementares às sequências de oligonucleotídeos presentes na *flow-cell*) e os *barcodes* (identificadores específicos para o DNA de cada paciente). A seguir, as bibliotecas foram enriquecidas pela adição de sondas biotiniladas (sequências selecionadas dos genes de todo o exoma). Após uma hibridação do DNA fragmentado com essas sondas, foi feita a captura das regiões de interesse por meio de *beads* magnéticos acoplados a estreptavidina. Os fragmentos capturados pela biotina-estreptavidina foram purificados e amplificados estando prontos para o sequenciamento paralelo em larga escala.

b. Amplificação clonal. Nesta etapa, as bibliotecas, com seus fragmentos de DNA ligados aos adaptadores foram depositados em uma lâmina especial, denominada *flowcell*, em cuja superfície estão fixados, de maneira paralela, duas espécies de oligonucleotídeos. Após a ligação dos

adaptadores aos seus oligonucleotídeos complementares presentes na superfície da *flowcell*, aconteceu a clusterização, onde cada molécula foi amplificada várias vezes por uma reação conhecida como PCR em ponte (*bridge* PCR). Ao final desta etapa, foram gerados *clusters* (clones) de moléculas de DNA idênticas à molécula original, ligadas covalentemente à superfície da *flowcell*.

c. Sequenciamento. Após a amplificação clonal, as moléculas antisense foram removidas enzimaticamente e o processo de sequenciamento iniciado com o acoplamento de um oligonucleotídeo iniciador especial (*sequencing primer*). Em seguida, nucleotídeos modificados com terminadores reversíveis marcados com fluoróforos específicos foram adicionados ao meio. A cada ciclo de incorporação, foram geradas imagens de toda a superfície da *flowcell* por meio de um *scanner* de fluorescência em cada um dos comprimentos de onda específico para cada fluoróforo. Os *clusters* presentes na superfície da *flowcell* foram então identificados e mapeados. A sobreposição das imagens produzidas a cada ciclo de incorporação propiciou a identificação da sequência de bases nucleotídicas de cada *cluster* de moléculas, ou seja, a sequência do fragmento que deu origem ao *cluster*. Este processo é conhecido como sequenciamento por síntese. As sequências produzidas pela plataforma possuíam de 36 a 100 pares de bases, podendo ser lidas tanto em configuração *single-end* (quando apenas a sequência *sense* da molécula do DNA é lida), quanto *paired-end* (quando a sequência *antisense* da molécula do DNA também é lida), permitindo leituras de fragmentos de

até 200 pares de base. Ao fim deste processo, as sequências lidas foram separadas entre si de acordo com seus *barcodes*, sendo então pareadas as sequências *sense* e *antisense*, criando sequências contíguas. Estas foram alinhadas para comparação com a sequência de DNA referência, de forma a permitir a comparação entre o sequenciamento obtido e a sequência referência.

3.3.4 Análise de bioinformática

A análise bioinformática foi realizada em colaboração com o Dr. Antônio Lerário (SELA e *Michigan University*), a partir dos arquivos gerados no processo de sequenciamento acima descritos.

O grande volume de dados gerados pelos sequenciadores de nova geração requer o emprego de ferramentas de bioinformática sofisticadas, a fim de que as poucas alterações genômicas de interesse sejam identificadas em meio a milhares de alterações não relacionadas ao processo de tumorigênese. Este processo é realizado por diversos programas de computador que funcionam em cadeia (ou *pipelines*). Uma biblioteca de exoma gera tipicamente 50-100 milhões de sequências de 100-150 pares de base, armazenadas de forma aleatória em dois arquivos fastq (*formard* e *reverse* no caso da configuração *paired-end*). Além da sequência literal de cada um dos fragmentos, os arquivos fastq também armazenam os escores de qualidade para cada uma das bases de determinada sequência e a unidade de leitura do sequenciador que originou aquele fragmento.

A partir dos dados brutos gerados pelo sequenciador e armazenados nos arquivos fastq, a análise bioinformática seguiu os passos detalhados a seguir:

a. Checagem da consistência dos arquivos fastq (cujo tamanho varia de dezenas a centenas de gigabytes) e cálculo de estatísticas básicas como número de sequências produzidas. Esta etapa foi realizada através do software FastQC.
b. Alinhamento das sequências das amostras a uma sequência referência do genoma humano (hg19 UCSC ou b37 GRC/NCBI). Nesta etapa, a origem de cada fragmento do DNA da amostra foi determinada. Existem vários programas alinhadores e a maioria leva em conta a qualidade da sequência produzida para fazer a melhor escolha. Optou-se pela utilização do algoritmo *mem* do programa BWA (http://bio-bwa.sourceforge.net/). Informações como coordenadas genômicas de cada base de determinada sequência, bem como *mismatches,* pequenas deleções ou inserções e suas respectivas coordenadas foram acrescentadas. Também foi calculado um escore de qualidade do alinhamento, que reflete a probabilidade deste ter sido efetuado de forma correta (isto é, realmente pertencer àquelas coordenadas genômicas).
c. Ordenamento das sequências. A etapa descrita anteriormente processa as sequências de forma aleatória, seguindo a ordem em que aparecem no arquivo fastq. Para as etapas posteriores, é necessário que as sequências sejam ordenadas de acordo com as coordenadas genômicas. Este ordenamento é feito simultaneamente a um processo de compactação, que gera arquivos binários em formato .bam. Esta etapa foi realizada pela ferramenta *bamsort* do software *biobambam2.*
d. Marcação de sequências duplicadas. Cópias idênticas de determinadas

sequências de uma biblioteca, também chamadas de duplicatas, são artefatos inerentes ao SPLE e podem gerar erros em etapas posteriores do processamento. Além disso, um número excessivo de sequências duplicadas pode indicar problemas na construção da biblioteca. Estas duplicatas devem ser marcadas para posteriormente serem quantificadas e desconsideradas em análises posteriores. Para a marcação das sequências duplicadas foi utilizada a ferramenta *bammarkduplicates* do software *biobambam2.* Após esta etapa, os arquivos bam ficaram prontos para os diversos tipos de análise descritos posteriormente.

e. Controle de qualidade dos arquivos bam. Após a marcação das sequências duplicadas foi feita uma análise quantitativa de alguns parâmetros para indicar a qualidade e a quantidade de sequências obtidas de determinada biblioteca. Além da qualidade global das sequências e da taxa de erro, foram calculados a quantidade de sequências duplicadas, o número de sequências não mapeadas, e cobertura média das regiões alvo do genoma. Esta verificação foi feita pelo software *Qualimap2.*

f. Pesquisa de alterações germinativas. Nesta etapa foram determinados, com bases estatísticas, todos os alelos divergentes do genoma referência, que foram reportados em arquivos de texto no formato *Variant Call Format* (VCF). Além das coordenadas genômicas e da alteração observada, estes arquivos também contém informações cruciais tais como a frequência do alelo alterado em relação ao normal para cada posição, escores de qualidade, nível de cobertura, e a frequência daquele alelo em relação a todas as amostras que foram processadas. Este procedimento foi feito pelo software

freebayes. Apesar de ser possível ler estes arquivos em um processador de texto ou planilha, as informações contidas neles são difíceis de serem contextualizadas e interpretadas. Para isso, é necessário a utilização de um software para anotação. São acrescentadas informações tais como a região genômica afetada por determinada alteração (região intergênica, intron, exon), e para as alterações exônicas, o tipo de alteração (sinônima, não sinônima, pequenas inserções ou deleções), qual gene e transcrito a alteração afeta e, finalmente, qual a consequência em nível proteico. Além disso, anotações referentes à frequências alélicas em bancos de dados públicos (incluindo o próprio banco de dados do SELA, que atualmente conta com cerca de 500 exomas), descrição de patogenicidade em bancos de dados clínicos, e também predição de patogenicidade de acordo com diversos algoritmos *in-silico* são incluídas. Para esta etapa, utilizou-se o software *annovar.* O resultado são arquivos de texto que podem ser manipulados por ferramentas padrão como o software *Excel* e que contêm todas as variantes já associadas a informações sobre localização, tipo, frequência em banco de dados e predições *in silico*.

g. Pesquisa de alterações somáticas. A pesquisa de alterações somáticas consiste na comparação pareada entre amostras oriundas da linhagem germinativa e tumoral do mesmo indivíduo. De forma simplificada, é feita uma busca de alterações que estejam presentes apenas no tumor (e não na linhagem germinativa). Alterações de ponto ou pequenas inserções e deleções são identificadas pelos *softwares* especificamente desenvolvidos para pesquisar eventos somáticos. Tipicamente, estes softwares processam

em paralelo a amostra germinativa e somática e utilizam modelos estatísticos bastante sofisticados que levam em consideração eventuais alterações do número de cópia em determinada região, contaminação do tecido tumoral por células da linhagem germinativa e heterogeneidade na população de células tumorais (subclones). Para este projeto, foram utilizados três softwares: o *varscan2,* o *Mutect2* e o *lancet.* Cada um se baseia em modelos estatísticos diferentes, aumentando as chances de alterações novas serem encontradas. Estes softwares geram arquivos VCF semelhantes aos gerados pelo *freebayes,* mas indicando as alterações somáticas. O processo de anotação e identificação de variantes é semelhante ao descrito anteriormente. Para esta etapa, foi utilizado também o banco de dados COSMIC, que consiste em um compêndio de alterações somáticas reportadas em diversos tipos de tumor. Além de pequenas inserções ou deleções, também foi realizada pesquisa de eventos cromossomais ou subcromossomais, como CNV ou LOH. Para estas análises, utilizou-se o software AdTex.

A seleção das variantes de interesse foi feita por um processo de filtragem, que selecionou as alterações com maior potencial de serem causadoras do fenótipo dentre as milhares de alterações que são tipicamente identificadas no exoma de cada indivíduo. Filtros sequenciais foram aplicados no arquivo VCF, para gerar uma lista limitada de variantes potencialmente relacionadas ao fenótipo.

O processo de filtragem das variantes germinativas e somáticas dos pacientes com aldosteronomas está ilustrado nas Figuras 6 e 7. Como o aldosteronoma constitui um processo neoplásico benigno, o número de variantes somáticas

selecionadas após o filtro 4 foi em média de 7 (1 a 16). Nos aldosteronomas estudados, grandes deleções ou amplificações não foram identificadas. O baixo número de variantes somáticas identificadas após a filtragem e a ausência de grandes perdas ou ganhos cromossômicos estão de acordo com estudo prévios de sequenciamento exômico de aldosteronomas[29,47].

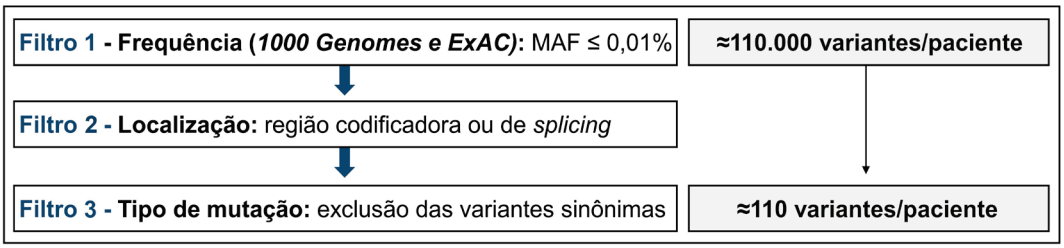


Figura 6 - Processo de filtragem das variantes germinativas identificadas no *Freebayes* que foram anotadas utilizando o ANNOVAR

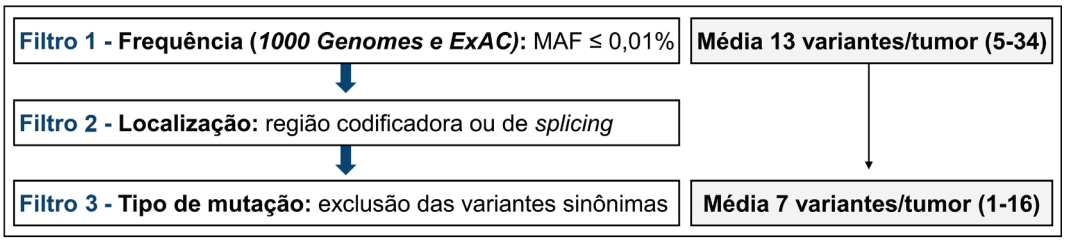


Figura 7 - Processo de filtragem das variantes somáticas identificadas no *Lancet* que foram anotadas utilizando o ANNOVAR

3.3.5 Seleção das variantes de interesse

Após o processo inicial de filtragem, as variantes foram também avaliadas quanto à frequência no banco de dados *Genome Aggregation Database* – gnomAD (http://gnomad.broadinstitute.org) e no banco de dados de 609 exomas de idosos brasileiros saudáveis presentes no Arquivo Brasileiro Online de Mutações - AbraOM (http://abraom.ib.usp.br/). Após a conclusão da filtragem, foram selecionadas, então, as variantes em genes codificadores de canais iônicos e que são expressos no córtex

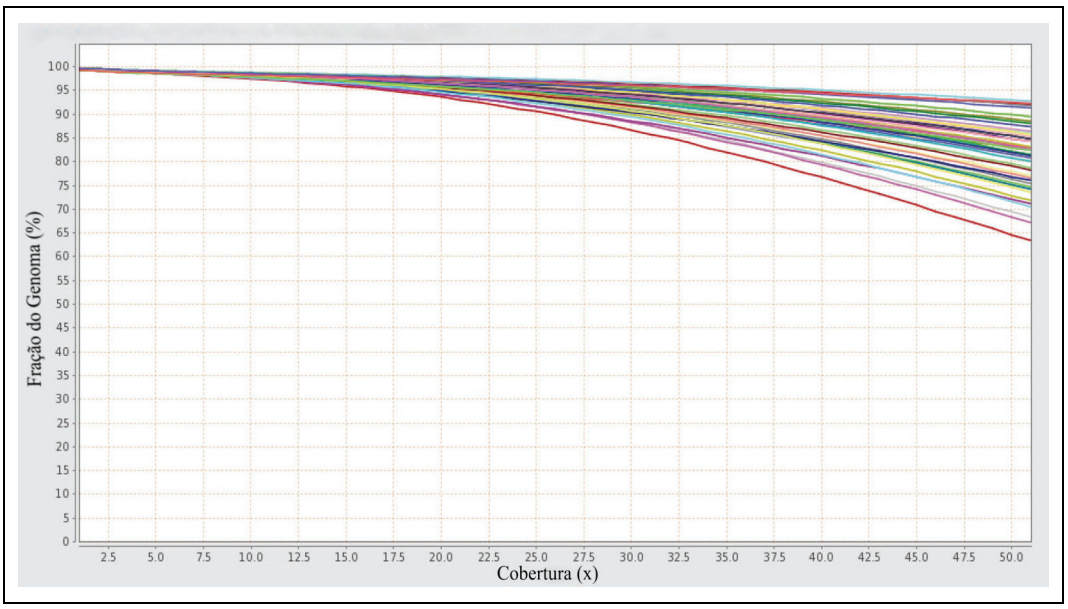
adrenal normal em um banco de tecidos normais de autópsia, denominado GTEx (https://www.gtexportal.org/). Adicionalmente, foram selecionadas variantes nos genes já previamente relacionados ao HP. Para confirmar se a chamada da variante era verdadeira, utilizou-se o programa *Integrative Genomics Viewer* (IGV) do *Broad Institute* (http://software.broadinstitute.org/software/igv/), que permite visualizar todos os *reads* gerados no sequenciamento alinhados ao genoma referência.

A predição de patogenicidade *in silico* das variantes foi analisada por meio de ferramentas já incluídas na VCF anotada (Anexo 7). Informações das variantes quanto à significância clínica, localização em domínio protéico e nível de conservação do aminoácido (AA) trocado entre as espécies foram pesquisadas no site MARRVEL - *Model organism aggregated resources for rare variant exploration* (https://www.marrvel.org). Esse site integra informações de diversos bancos de dados genéticos de humanos e de modelos animais (OMIM, ExAC, ClinVar, Geno2MP, DGV e DECIPHER). Posteriormente, as variantes de interesse foram confirmadas por Sanger.

A classificação das variantes germinativas em relação ao fenótipo do paciente foi realizada seguindo a recomendação da *American of Medical Genetics and Genomics e Association for Molecular Pathology* (ACMG-AMP)[58]. Para determinação de patogenicidade, esta classificação leva em consideração a frequência na população, análise *in silico*, dados de segregação, dados de análises funcionais, dentre outros. A variante é classificada em patogênica (P), provavelmente patogênica (LP), variante de significado incerto (VUS), provavelmente benigna (LB) ou benigna (B). Foi utilizado o auxílio de um programa denominado InterVar (http://wintervar.wglab.org/), que classifica as variantes de acordo com a recomendação da ACMG-AMP.

3.3.6 Avaliação das métricas do exoma

A cobertura vertical média foi de 104 vezes. Mais de 90% das sequências alvo foram cobertas pelo menos 20 vezes (Figura 8).



Mais de 90% das sequências alvo foram cobertas pelo menos 20x.

Figura 8 - Gráfico de qualidade das corridas do exoma

3.4 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS (*IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0. Armonk, NY*). Dados contínuos foram expressos por valores de mediana (mínimo ao máximo). Variáveis numéricas contínuas foram analisadas por meio do teste Mann-Whitney U. O teste do χ^2 foi utilizado para análise de variáveis categóricas. A regressão binária logística foi utilizada para análise multivariada, que incluiu as variáveis com $p < 0{,}2$ na análise univariada. Um valor de $p < 0{,}05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Estudo Molecular dos Aldosteronomas

Sessenta e dois aldosteronomas foram submetidos ao estudo molecular das regiões *hot-spot* do *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* e *CTNNB1* pelo método de Sanger. O *CACNA1D* foi analisado em 11 aldosteronomas por SPLE. Variantes patogênicas somáticas em heterozigose foram identificadas em 34 de 62 (54,8%) aldosteronomas (Tabela 6). As variantes identificadas no *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* e *CTNNB1* foram previamente descritas. Uma variante somática nova foi identificada no *CACNA1D*. Assim como na literatura, as variantes patogênicas no *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* e *CTNNB1* foram mutuamente exclusivas. Defeitos germinativos foram excluídos em todos os pacientes com aldosteronomas contendo variantes somáticas.

Variantes patogênicas somáticas no *KCNJ5* foram detectadas em 28 de 62 (45,2%) aldosteronomas. Duas variantes recorrentes foram encontradas: p.Gly151Arg em 13 de 28 (46,4%) e p.Leu168Arg em 14 de 28 (50%) aldosteronomas. A variante patogênica p.Glu145Gln foi identificada em um (3,6%) aldosteronoma (Tabela 6, Figura 9). Adicionalmente, o polimorfismo p.Glu282Gln (rs7102584) foi encontrado em todos os casos.

Tabela 6 - Frequência das variantes patogênicas somáticas encontradas em 62 aldosteronomas

	Variantes patogênicas	n	Frequência (%)
KCNJ5	p.Gly151Arg p.Leu168Arg p.Glu145Gln	28	45,2
ATP1A1	p.Leu104Arg	2	3,2
ATP2B3	p.Leu425_Val426del	1	1,6
CTNNB1	p.Ser45Pro	2	3,2
CACNA1D	p.Leu276Pro	1	1,6
Total		**34**	**54,8**

O estudo do gene *ATP1A1* identificou a variante patogênica p.Leu104Arg em dois (3,2%) casos. A variante patogênica p.Leu425_Val426del do *ATP2B3* foi detectada em um (1,6%) aldosteronoma e a variante patogênica p.Ser45Pro do *CTNNB1* em dois (3,2%) aldosteronomas (Tabela 6, Figura 10).

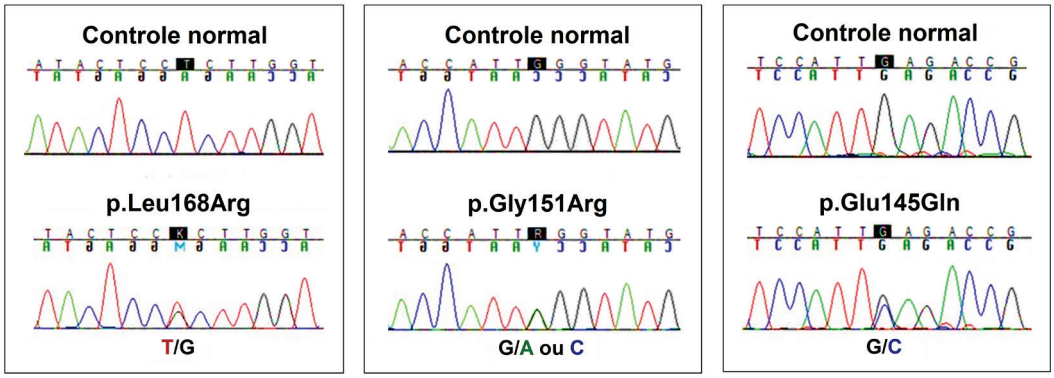


Figura 9 - Eletroferogramas obtidos por sequenciamento pelo método de Sanger de três aldosteronomas com as variantes patogênicas p.Leu168Arg, p.Gly151Arg e p.Glu145Gln do *KCNJ5*

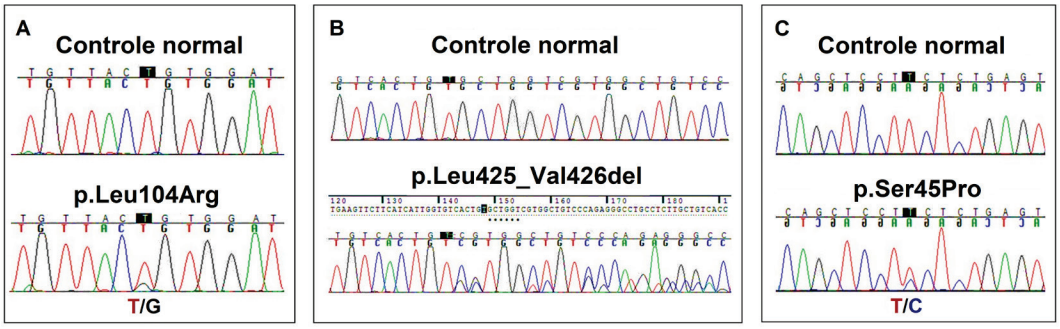


Figura 10 - Eletroferogramas obtidos por sequenciamento pelo método de Sanger de três aldosteronomas com variantes patogênicas. A, Variante p.Leu104Arg do *ATP1A1*. B, Variante p.Leu425_Val426del do *ATP2B3*. C, Variante p.Ser45Pro do *CTNNB1*

O estudo do gene *CACNA1D* identificou a variante somática p.Leu276Pro (c.827T>C) em um (1,6%) aldosteronoma, que foi confirmada por Sanger (Figura 11). A variante p.Leu276Pro, localizada no exon 6, nunca foi descrita em bancos de dados (gnomAD, 1000 genomes, ExAC e ABraOM), altera aminoácido altamente conservado entre as espécies, está localizada em região de domínio proteico e é considerada deletéria em mais de três algoritmos de predição *in silico*. Dessa forma, a variante p.Leu276Pro do *CACNA1D* foi considerada provavelmente patogênica.

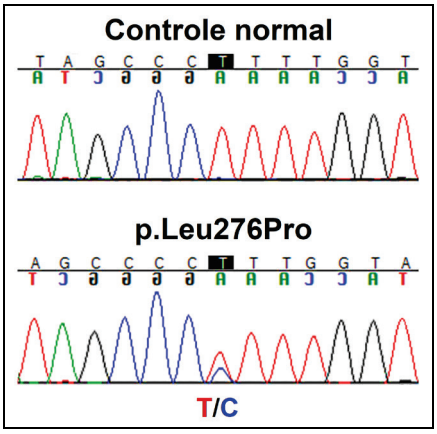


Figura 11 - Eletroferograma obtido pela validação da variante p.Leu276Pro do *CACNA1D* por sequenciamento pelo método de Sanger

4.2.1 Correlação das variantes patogênicas no *KCNJ5* com parâmetros clínicos e bioquímicos

Aldosteronomas com variantes patogênicas no *KCNJ5* foram diagnosticados mais frequentemente em mulheres (73,7% *vs.* 46,9%; X^2= 3,95; p = 0,047) e em idades mais jovens [42,5 anos (20 a 68) *vs.* 53,5 anos (33 a 68); p = 0,002] quando comparado com tumores sem variantes no *KCNJ5*. O tamanho do nódulo foi maior em aldosteronomas com variantes patogênicas no *KCNJ5* [2,0 cm (0,7 a 4,0) *vs.* 1,3 cm (0,7 a 2,5); p = 0,0001]. O percentual de pacientes com tempo de HAS menor que 5 anos foi similar nos dois grupos. A frequência de índice de massa corporal normal (IMC < 25 kg/m^2) (69% *vs.* 31%; X^2 =2,76; p =0,097) foi maior nos pacientes com aldosteronoma com variante no *KCNJ5*, mas não atingiu significância estatística (Tabela 7).

Tabela 7 - Correlação da presença de variante patogênica no *KCNJ5* com parâmetros clínicos e hormonais

	Tumor com variante patogênica no *KCNJ5* (n= 28)	Tumor sem variante patogênica no *KCNJ5* (n= 34)	*P*
Gênero feminino	73,7%	46,9%	0,047
IMC <25 kg/m^2	69%	31%	0,097
Idade ao diagnóstico (anos)	42,5 (20-68)	53,5 (33-68)	0,002
Hipocalemia	82%	74%	0,63
Tempo de HAS <5 anos	35,7%	25,9%	0,18
Aldosterona (VN: < 10 ng/dL)	28,7 (15,2-195)	28,5 (11,7-84,2)	0,49
APR (VN: 1,5-5,7 ng/mL/h)	0,16 (0,02-0,33)	0,2 (0,03-1,1)	0,096
Renina (VN: 4,4-46 uUI/mL)	1,6 (0,6-4)	1,6 (0,4-8,2)	1,0
Relação A/APR (VN: <30)	204 (66-1466)	170 (31-633)	0,086
Relação A/R (VN: <2)	17,9 (5,5-122)	17,3 (2,9-53)	0,337
Tamanho do nódulo (cm)	2 (0,7-4)	1,3 (0,7-2,5)	0,0001
Remissão da HAS	50%	15%	0,003
Seguimento (meses)	26,5 (6-76)	24 (6-75)	0,7

IMC: índice de massa corporal; APR: atividade plasmática de renina; A: aldosterona; HAS: hipertensão arterial sistêmica; VN: valor de normalidade.

Os valores de aldosterona, renina e da relação A/R ou A/APR não foram influenciados pela presença de variantes no *KCNJ5*. A frequência de hipocalemia também foi semelhante nos pacientes com tumores com e sem variante no *KCNJ5* (82% *vs.* 74%; $p = 0,63$) (Tabela 7).

A remissão pós-operatória da HAS foi observada em 50% dos pacientes com tumor contendo variante patogênica no *KCNJ5*, enquanto apenas 15% dos pacientes com tumor sem variante no *KCNJ5* tiveram remissão da HAS ($X^2 = 8,58$, $p = 0,003$). A mediana de seguimento dos indivíduos com tumor com e sem variante no *KCNJ5* foi semelhante (Tabela 7).

4.2.2 Fatores preditores de remissão da HAS

Foram analisados os fatores preditores de sucesso clínico completo (remissão da HAS) nos pacientes com aldosteronomas submetidos a adrenalectomia unilateral e que apresentaram cura bioquímica do HP. Na análise univariada, a presença de mutação somática no *KCNJ5* se correlacionou com remissão da HAS após adrenalectomia ($p = 0,003$). Gênero feminino ($p = 0,083$), IMC < 25 Kg/m^2 ($p = 0,063$) e tempo de HAS < 5 anos ($p = 0,2$) não se correlacionaram com sucesso clínico completo após adrenalectomia. Na análise multivariada com as variáveis que atingiram $p < 0,2$, somente a presença de variante patogênica somática no *KCNJ5* foi um preditor independente de remissão da HAS ($p = 0,03$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Análise multivariada dos fatores preditores de remissão da HAS após adrenalectomia unilateral em pacientes com HP

	Risco relativo	Intervalo de confiança 95%	*p*
Gênero feminino	1,4	0,37-5,6	0,63
IMC <25 kg/m^2	2,2	0,54-9,1	0,27
Tempo de HAS <5 anos	1,1	0,25-4,92	0,88
Variante patogênica somática do *KCNJ5*	4,6	1,16-18,2	0,03

IMC: índice de massa corporal; HAS: hipertensão arterial.

4.2.2.1 Achados da análise do exoma

Após a filtragem das variantes na VCF anotada (Figuras 6 e 7), foi realizada uma busca ativa por variantes em genes codificadores de canais iônicos (n = 11 genes) ou previamente relacionados com tumor ou hiperplasia adrenal cortical (n = 1 gene). Variantes germinativas raras (MAF < 0,01% no gnomAD, 1000 genomes, ExAC e ABraOM), em resíduos conservados de genes codificadores de canais iônicos, que são expressos no córtex suprarrenal normal (GTEx, banco de tecidos normais de autópsia) e consideradas deletérias pela análise *in silico* (≥ 3 ferramentas de predição de patogenicidade *in silico*, Anexo 7) foram selecionadas para segregação familial (Tabela 9). As variantes presentes em genes com expressão baixa ou ausente na suprarrenal (GTEx) foram excluídas (Tabela 10). As variantes germinativas selecionadas foram confirmadas por Sanger. Todas as variantes germinativas selecionadas foram classificadas como variantes de significado incerto, segundo os critérios da ACMG-AMP.

Uma nova variante somática em heterozigose no gene *CACNA1D* (p.Leu276Pro), patogênica *in silico* (≥ 3 ferramentas de predição *in silico*), foi identificada em um aldosteronoma. Além dessa variante do *CACNA1D*, nenhuma outra variante somática preencheu os critérios de seleção.

Tabela 9 - Análise das variantes germinativas selecionadas para segregação familial

Gene	Variante	Tipo*	MAF (%) gnomAD	MAF (%) ABraOM	Domínio proteico	AA conservado	Deletéria em ≥ 3 algoritmos	Classificação ACMG
CACNA1H	p.Pro559Thr	*missense*	0	0	Não	Sim	Sim	VUS
CACNA1I	p.Arg178Cys	*missense*	0,003	0	Sim	Sim	Sim	VUS
ATP13A3	p.Glu52Ala	*missense*	0	0	Sim	Sim	Sim	VUS
KCNC4	p.Tyr507Ser	*missense*	0	0	Não	Sim	Sim	VUS

*Todas as variantes selecionadas são em heterozigose; MAF: frequência alélica mínima; AA: aminoácido; ACMG: *American of Medical Genetics and Genomics;* VUS: variante de significado incerto.

Tabela 1- - Análise das variantes germinativas em genes codificadores de canais iônicos ou relacionados a hiperplasia adrenal que não foram selecionadas para segregação familial

Gene	Variante	Tipo	MAF (%) gnomAD	MAF (%) ABraOM	Domínio proteico	AA conservado	Deletéria em ≥ 3 algoritmos	Expressão na adrenal (GETx)
CACNA1G	p.Thr2185Ile	*missense*	0	0	Não	Sim	Sim	Ausente
CACNA1G	p.Thr511Met	*missense*	0,003	0	Não	Sim	Sim	Ausente
CACNA1C	p.Gln924Arg	*missense*	0	0	Sim	Sim	Sim	Ausente
CACNA1A	p.Gly953Glu	*missense*	0	0	Não	Não	Sim	Ausente
CACNA1A	p.Glu890Lys	*missense*	0	0	Não	Sim	Não	Ausente
CACNA1A	p.Pro996delinsGluGlyPro	*nonsense*	0	0	Não	Sim	Não	Ausente
KCNJ12	p.Tyr342Cys	*missense*	0	0	Sim	Sim	Sim	Ausente
KCNA3	p.501del	*nonsense*	0	0,0004	Não	Sim	Não	Ausente
ATP13A5	c.1915+3 A>C	*splicing*	0	0	-	-	*	Ausente
ATP1A3	p.Leu1128fs	*frameshift*	0	0,08	Não	Não	Não	Ausente
PDE6B	p.Ala35Val	*missense*	0	0	Não	Não	Não	Ausente

*Altera sitio de splicing (Human Splicing Finder). MAF: frequência alélica mínima; AA: aminoácido.

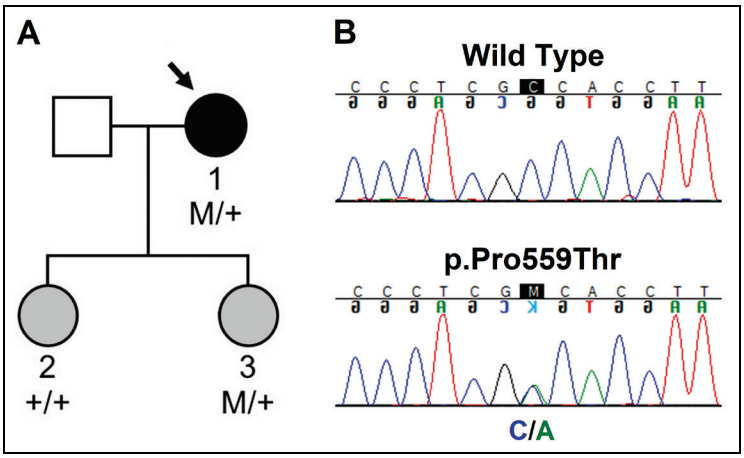
4.2.2.2 Análise das variantes germinativas selecionadas

a) Gene *CACNA1H*: c.1675C>A; p.Pro559Thr

O gene *CACNA1H,* localizado no cromossomo 16p13, codifica a subunidade α 1H do canal de cálcio do tipo T, $Ca_v3.2$. O *CACNA1H* apresenta uma elevada expressão em glândulas suprarrenais normais (GTEx). Como descrito previamente, esse canal de cálcio já foi associado ao fenótipo de HP familial e uma variante provavelmente patogênica germinativa no *CACNA1H* foi descrita em um paciente com aldosteronoma[43,45].

A variante p.Pro559Thr, localizada no exon 9, nunca foi descrita, altera um aminoácido altamente conservado entre as espécies e é considerada deletéria em três algoritmos de predição *in silico* (Tabela 9). Essa variante foi encontrada em uma paciente de 64 anos, que teve o diagnóstico de HAS aos 36 anos e o diagnóstico de HP aos 56 anos (Figura 12). A paciente apresentava ao diagnóstico aldosterona plasmática de 59,2 ng/dL, renina plasmática de 2,4 uUI/mL (VN: 4,4-46 uUI/mL) e hipocalemia. Evoluiu com cura bioquímica do HP, sem remissão da HAS, porém com melhora do controle pressórico após adrenalectomia. A análise anatomopatológica mostrou adosteronoma de 1,8 cm.

A variante foi identificada em uma das filhas de 37 anos, que teve o diagnóstico de HAS aos 30 anos de idade, porém com investigação de HP negativa (Aldosterona: 9,6 ng/dL; Renina: 8,1 uUI/mL) (Figura 12). A filha carreadora da variante estava em uso de losartana 100 mg/dia e hidroclorotiazida 25 mg/dia com bom controle pressórico. Como o caso índice teve diagnóstico do HP somente aos 56 anos, a filha carreadora dessa variante continua em seguimento no Ambulatório de Endocrinologia.



M: mutante.

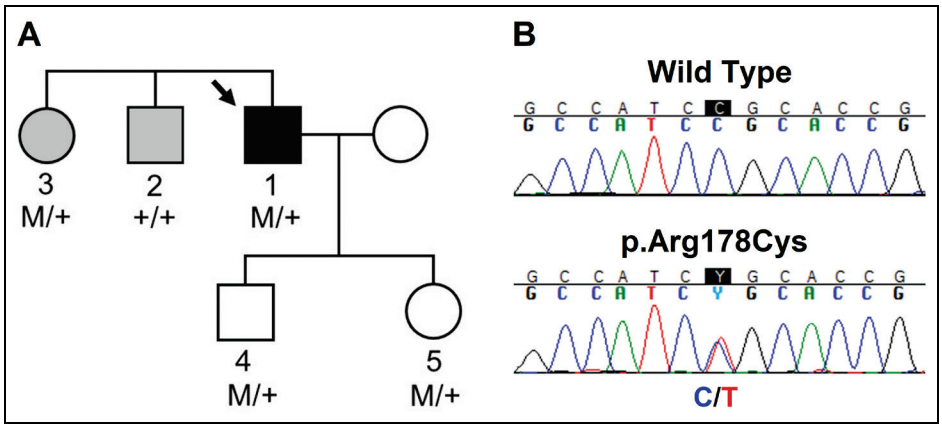
Figura 12 - A, Heredograma mostrando segregação familial da variante p.Pro559Thr do *CACNA1H*. Preenchimento preto, indivíduo portador de HP. Preenchimento cinza, indivíduo portador de HAS. B, Eletroferograma obtido pela validação da variante por sequenciamento pelo método de Sanger

b) Gene CACNA1I: c.532C>T; p.Arg178Cys

O gene *CACNA1I,* localizado no cromossomo 22q13, codifica a subunidade α 1I do canal de cálcio do tipo T, $Ca_v3.3$. O *CACNA1I* é altamente expresso em glândulas suprarrenais normais (GTEx). Recentemente, polimorfismos no *CACNA1I* foram associados à esquizofrenia[59].

A variante p.Arg178Cys no exon 4 do *CACNA1I* é rara e altera um aminoácido altamente conservado entre as espécies em região de domínio proteico, além de ser deletéria em mais de três algoritmos de predição *in silico* (Tabela 9). Essa variante foi identificada em um paciente com 52 anos, que teve o diagnóstico de HAS aos 20 anos e diagnóstico de HP aos 38 anos (Figura 13). O paciente apresentava ao diagnóstico aldosterona plasmática de 18 ng/dL, APR de 0,9 ng/mL/h e potássio normal. Após adrenalectomia, evoluiu com cura bioquímica do HP e melhora do controle pressórico. A análise anatomopatológica mostrou adosteronoma de 2,4 cm.

A variante p.Arg178Cys foi identificada na irmã de 50 anos, portadora de HAS desde os 30 anos e com rastreamento negativo para HP (Aldosterona: 9,0 ng/dL; Renina: 46,3 uUI/mL). A irmã, carreadora da variante, estava em uso de atenolol 50 mg/dia e losartana 100 mg/dia com bom controle pressórico. A variante foi identificada também nos dois filhos do caso índice (homem de 26 anos e mulher de 24 anos), ambos normotensos e com rastreamento negativo para HP (Aldosterona: 11,0 e 26,1 ng/dL; Renina: 25,4 e 18,7 uUI/mL, respectivamente) (Figura 13).



M: mutante.

Figura 13 - A, Heredograma mostrando segregação familial da variante p.Arg178Cys do *CACNA1I*. Preenchimento preto, indivíduo portador de HP. Preenchimento cinza, indivíduos portadores de HAS. B, Eletroferograma obtido pela validação da variante por sequenciamento pelo método de Sanger

c) Gene *ATP13A3*: c.155A>C; p.Glu52Ala

O gene *ATP13A3,* localizado no cromossomo 3q29, codifica a ATPase 13A3, uma proteína transmembrana da família de proteínas ATPase do tipo P que transporta uma variedade de cátions. O *ATP13A3* está expresso em glândulas suprarrenais normais (GTEx) e não foi associado a nenhum fenótipo até o momento.

A variante p.Glu52Ala, localizada no exon 3, está ausente nos bancos de dados, altera aminoácido altamente conservado em domínio proteico e é considerada

deletéria em mais de três algoritmos de predição *in silico* (Tabela 8). Essa variante foi encontrada em um paciente de 38 anos, que teve o diagnóstico de HP aos 33 anos (Figura 14). O paciente apresentava ao diagnóstico aldosterona plasmática de 40,5 ng/dL, renina plasmática de 1,6 uUI/mL e hipocalemia. Após adrenalectomia, evoluiu com cura bioquímica do HP e melhora do controle pressórico. A análise anatomopatológica mostrou adosteronoma de 2,0 cm. Até o momento, não foi possível realizar a segregação familial.

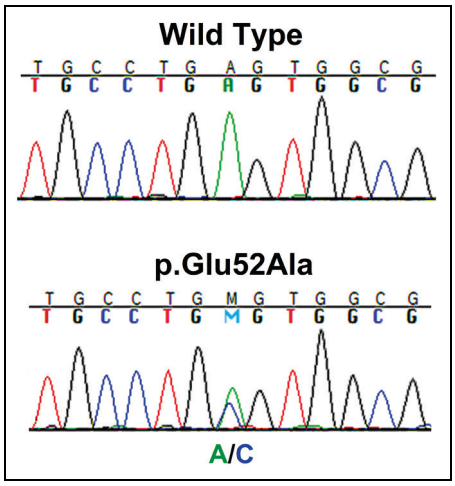


Figura 14 - Eletroferograma obtido pela validação da variante p.Glu52Ala do gene *ATP13A3* por sequenciamento pelo método de Sanger

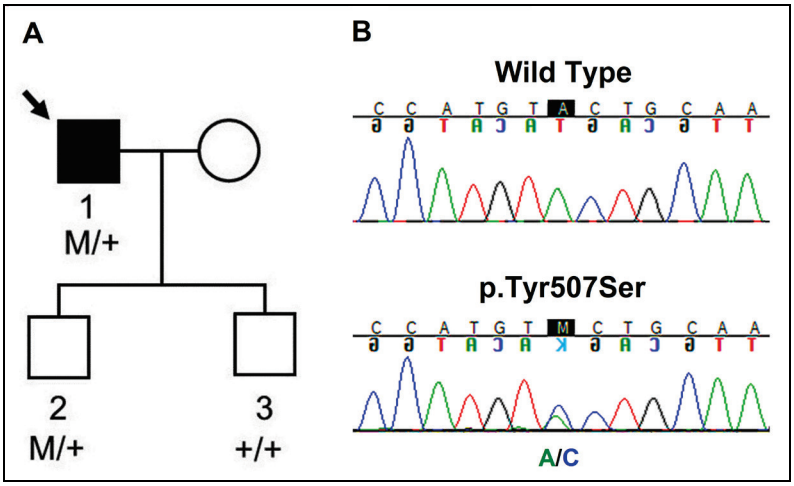
d) Gene *KCNC4*: c.1520A>C; p.Tyr507Ser

O gene *KCNC4,* localizado no cromossomo 1p13, codifica o canal de potássio voltagem-dependente $K_v3.4$. O *KCNC4* é altamente expresso em glândulas suprarrenais normais (GTEx). Até o momento, nenhum fenótipo foi associado ao *KCNC4*.

A variante p.Tyr507Ser, localizada no exon 2, está ausente nos bancos de dados, altera aminoácido altamente conservado entre as espécies e é considerada deletéria em mais de três algoritmos de predição *in silico* (Tabela 9). Essa variante

foi identificada em um paciente de 61 anos, que teve o diagnóstico de HAS aos 35 anos e o diagnóstico de HP aos 57 anos (Figura 15). O paciente apresentou ao diagnóstico aldosterona plasmática de 64,2 ng/dL, renina plasmática de 1,6 uUI/mL e hipocalemia. Evoluiu com cura bioquímica do HP e melhora do controle pressórico após adrenalectomia. A análise anatomopatológica mostrou adosteronoma de 1,7 cm.

A variante foi identificada em um filho do caso índice, atualmente com 37 anos e normotenso (Figura 15). O rastreamento para HP mostrou aldosterona plasmática de 7,8 ng/dL e renina plasmática de 3,0 uUI/mL (VN: 4,4-46 uUI/mL). Infelizmente não se conseguiu manter contato para repetir a investigação de HP no seguimento. Apesar do valor de aldosterona < 10 ng/dL, a renina suprimida indica a necessidade de reavaliação desse carreador.



Preenchimento preto, indivíduo portador de HP.

Figura 15 - A, Heredograma mostrando segregação familiar da variante p.Tyr507Ser do *KCNC4*. B, Eletroferograma obtido pela validação da variante p.Tyr507Ser por sequenciamentor pelo método de Sanger

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foram investigadas mutações somáticas em genes codificadores de canais iônicos (*KCNJ5*, *ATP1A1* e *ATP2B3*) e no gene *CTNNB1*, previamente identificadas em aldosteronomas. Posteriormente, foram selecionados pacientes com aldosteronomas sem variantes patogênicas nos genes acima para genotipar o exoma por SPLE. Além de objetivar a identificação de variantes somáticas em novos genes candidatos, considerou-se que as variantes germinativas têm um papel relevante na patogênese dos aldosteronomas. Até o momento somente uma variante germinativa provavelmente patogênica no *CACNA1H* foi descrita em um paciente adulto com aldosteronoma aparentemente esporádico[45]. Vale ressaltar que a maioria dos aldosteronomas na presente coorte apresenta hiperplasia perinodular moderada a acentuada. Essas evidências sugerem um modelo de dois eventos moleculares para o desenvolvimento dos aldosteronomas: um defeito germinativo responsável pela hiperplasia da zona glomerulosa e um defeito somático que seja responsável pelo desenvolvimento do tumor produtor de aldosterona[60,61].

Na última década, diversos estudos investigaram a presença de variantes somáticas em genes que codificam canais iônicos em aldosteronomas[40,47-49]. Na coorte da ENSAT, variantes patogênicas somáticas foram identificadas em 54% dos tumores, sendo o *KCNJ5* o gene mais frequentemente mutado (38%)[46]. A frequência de variantes patogênicas no *KCNJ5* variou de 34% em uma população italiana até 79% em adosteronomas de japoneses[46,62-64]. De forma semelhante à coorte da

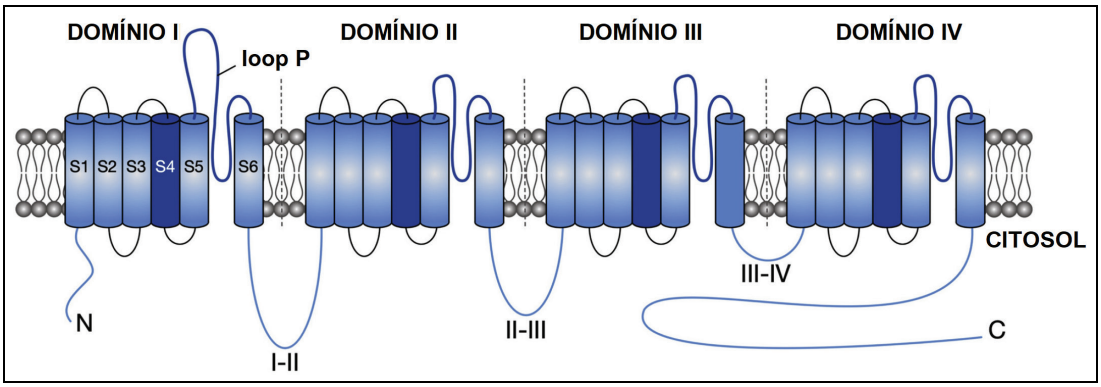
ENSAT, foram identificadas variantes patogênicas somáticas no *KCNJ5* em 45,2% dos aldosteronomas. As variantes p.Gly151Arg e p.Leu168Arg apresentaram frequências semelhantes e foram responsáveis pela grande maioria (96,4%) das variantes do *KCNJ5,* de forma similar a estudos prévios[46,62,65].

A correlação genótipo-fenótipo na presente casuística confirmou os dados de uma metanálise que incluiu 1636 pacientes com aldosteronomas[66]. Nessa metanálise, os indivíduos com aldosteronomas com variantes patogênicas no *KCNJ5* foram mais jovens, mais frequentemente mulheres e apresentaram nódulos maiores quando comparados aos pacientes com aldosteronomas sem mutação no *KCNJ5*[66]. De forma contrária a essa metanálise, que evidenciou valores mais elevados de aldosterona pré-operatória nos pacientes com tumores com variantes patogênicas no *KCNJ5,* não foram encontradas diferença nos valores de aldosterona entre os dois grupos.

Nesse estudo, foram identificados poucos casos com variantes patogênicas somáticas nos genes *ATP1A1, ATP2B3* e *CTNNB1.* Em decorrência disso, não foi possível avaliar a correlação dessas variantes com parâmetros clínicos. Em um estudo multicêntrico que avaliou 308 aldosteronomas, os pacientes com aldosteronomas com variantes patogênicas somáticas no *ATP1A1* e *ATP2B3* foram mais frequentemente homens e apresentaram níveis mais elevados de aldosterona e mais baixos de potássio[47]. Åkerström *et al.*[52] identificaram variantes patogênicas somáticas no gene *CTNNB1* em 10 (5,1%) de 198 aldosteronomas. Os tumores com variantes do *CTNNB1* foram mais frequentemente diagnosticados em mulheres (60%) e não houve correlação entre a presença de variantes com os níveis pré-operatórios de aldosterona, tamanho do tumor ou idade ao diagnóstico[52].

Dentre os 11 casos estudados por SPLE na presente coorte, identificou-se variante somática no *CACNA1D* em apenas um aldosteronoma. A nova variante

p.Leu276Pro altera um aminoácido conservado, localizado no segmento S5 do domínio transmembrana I do $Ca_v1.3$ (Figura 16). Considerando que essa é uma região de grande importância para a formação do poro do canal e regulação da seletividade do canal ao Ca^{2+}, é esperado que a variante p.Leu276Pro altere o comportamento eletrofisiológico desse canal[67]. Em virtude do número reduzido de casos que foram submetidos a genotipagem do exoma, não foi possível determinar a prevalência de mutações do *CACNA1D* na presente coorte. Na coorte da ENSAT, variantes patogênicas no *CACNA1D* foram identificadas em aproximadamente 10% dos aldosteronomas[46]. Não houve associação das variantes patogênicas somáticas no *CACNA1D* com parâmetros clínicos e bioquímicos[46].



[Fonte: Adaptado de Weiss *et al.*[67]]

Figura 16 - Representação esquemática da subunidade α1 dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependente do tipo T. A subunidade α1 consiste de quatro repetições homólogas (domínios I – IV), cada uma com seis segmentos transmembrana (S1 – S6) e um loop reentrante extracelular "loop P" entre os segmentos S5 e S6. Os segmentos S4 de cada um dos quatro domínios são ricos em arginina e formam o sensor de voltagem do canal. Os segmentos S5 e S6 e o loop P formam o domínio do poro do canal e compreendem os elementos que regulam a seletividade do canal ao Ca^{2+}. As regiões N e C terminais e as alças citoplasmáticas que conectam os quatro domínios transmembrana (I-II, II-III, III-IV) são importantes para a ligação de proteínas reguladoras do canal

Recentemente, o estudo molecular guiado pela imuno-histoquímica para CYP11B2 por meio da microdissecção dessas áreas positivas contribuiu para

aumentar a frequência de identificação de variantes somáticas em nódulos hiperplásicos adjacentes ou em focos de células positivas para CYP11B2[68-70]. Em 2018, Nanba *et al.*[68] investigaram a prevalência de variantes patogênicas somáticas em aldosteronomas com extração de DNA tumoral guiada pela expressão da CYP11B2 por imunohistoquímica. Os genes mais frequentemente mutados foram *KCNJ5* (43%), *CACNA1D* (21%), *ATP1A1* (17%), *ATP2B3* (4%) e *CTNNB1* (3%). Embora essa metodologia tenha aumentado a frequência de variantes somáticas no *CACNA1D* e *ATP1A1,* a prevalência de variantes no *KCNJ5* não foi alterada. Como no presente estudo as correlações clínicas foram feitas com a presença de variantes no *KCNJ5*, acredita-se que a ausência da extração de DNA guiada pela expressão da CYP11B2 não teve impacto nos presentes achados, principalmente os relacionados a remissão da HAS. Atualmente, a imuno-histoquímica para CYP11B2 está em andamento na presente casuística.

Em 2010, Nishimoto *et al.*[71] identificaram por imunohistoquímica aglomerados de células subcapsulares positivas para CYP11B2 em glândulas suprarrenais normais e na zona glmerulosa de glândulas com aldosteronomas. Esses aglomerados de células foram denominados APCCs. Os APCCs aumentam com a idade e acumulam variantes em genes frequentemente mutados em aldosteronomas (*CACNA1D*, *ATP1A1* e *ATP2B3*)[72]. O gene mais frequentemente mutado nas APCCs é o *CACNA1D* em 76% dos casos[73]. Variantes patogênicas no *KCNJ5* não foram identificadas nas APCCs.

Recentemente, o estudo PASO, um painel internacional de 31 especialistas de 28 centros, desenvolveu critérios para consenso de desfechos bioquímico e clínico após adrenalectomia por HP unilateral[74]. No presente estudo, foram empregados os

critérios do estudo PASO para definir o sucesso bioquímico completo (cura do HP) e clínico completo (remissão da HAS) após a adrenalectomia. A remissão da HAS ocorre em cerca de 50% (variação de 35% a 80%) dos pacientes com aldosteronoma após adrenalectomia unilateral[6]. Essa grande variabilidade da taxa de remissão da HAS pode ser decorrente da ausência de padronização dos critérios de cura do HP. Fatores independentes associados à remissão da HAS no pós-operatório incluem ter no máximo um parente de primeiro grau com HAS e o uso de dois ou menos anti-hipertensivos no pré-operatório[22]. Menor tempo de duração da HAS até o diagnóstico de HP, maior relação A/R no pré-operatório e níveis mais elevados de aldosterona urinária foram associados à remissão da HAS apenas na análise univariada[22]. O tempo de duração da HAS menor que 5 anos também foi associado à cura da HAS em estudos menores, mas apenas na análise univariada ou quando o ponto de corte para a resolução da HAS foi de 160/95 mmHg[21,75,76]. Outras razões para a persistência de HAS após adrenalectomia foram HE e idade avançada[6,21,22]. A taxa de remissão da HAS na presente coorte foi 31%. Esse achado deve-se, provavelmente, ao longo tempo de duração da HAS até o diagnóstico de HP dos pacientes do presente estudo, com mediana de 14 anos.

Apesar dos avanços na patogênese molecular dos aldosteronomas, poucos estudos investigaram o impacto das alterações moleculares no desfecho clínico após adrenalectomia[77-80]. Em 2013, Arnesen *et al.*[77] mostraram que variantes patogênicas somáticas no *KCNJ5* estavam associadas com remissão da HAS após cirurgia em 28 aldosteronomas. Em uma coorte australiana, remissão da HAS e idade menor que 50 anos foram associados a presença de variante patogênica no *KCNJ5*[78]. Adicionalmente, variante patogênica somática no *KCNJ5* foi preditor independente

de remissão da HAS em uma coorte japonesa de 136 aldosteronomas[80]. Nesse estudo, a frequência de variantes patogênicas no *KCNJ5* foi de 74% e a taxa de remissão da HAS em toda a casuística foi de 60%[80]. Contudo, os critérios clínicos para cura do HP não foram definidos nesses estudos prévios[77-79].

Como mencionado anteriormente, a população japonesa tem uma frequência mais elevada de variantes patogênicas no *KCNJ5.* Recentemente, Nanba *et al.*[81] mostraram que variantes patogênicas somáticas no *CACNA1D* constituem o defeito genético mais frequente (42%) em aldosteronomas de americanos de origem africana. Esses dados demonstram que a patogênese molecular dos aldosteronomas é heterogênea e possui influência étnica. No presente estudo, foi demonstrado o impacto da presença de variante somática no *KCNJ5* em uma coorte de aldosteronomas de brasileiros, que apresentam *background* gético distinto às populações previamente estudadas.

Embora os pacientes com aldosteronomas com variante patogênica no *KCNJ5* tenham sido mais jovens, a frequência de histórico de HAS menor que 5 anos não foi significativamente diferente nos dois grupos. Dessa forma, pode-se especular que a associação de variantes patogênicas somáticas no *KCNJ5* com a remissão da HAS após adrenalectomia não se deve somente a um diagnóstico mais precoce. A presença de variantes patogênicas somáticas no *KCNJ5* em aldosteronomas tem impacto no seguimento dos pacientes com HP. Pacientes com aldosteronomas sem variantes patogênicas somáticas no *KCNJ5* devem ter o controle pressórico avaliado de forma mais frequente no pós-operatório. Como duas variantes (p.Gly151Arg e p.Leu168Arg) representam 96,4% das alterações moleculares no *KCNJ5,* a investigação de variantes patogênicas no *KCNJ5* pode ser feita de maneira simples e rápida no pós-operatório com apenas uma reação de sequenciamento por Sanger.

No presente estudo, o SPLE dos 11 aldosteronomas que não apresentaram variantes somáticas nos genes estudados por Sanger identificou apenas uma variante somática (p.Leu276Pro) provavelmente patogênica no *CACNA1D*. A genotipagem do exoma dos aldosteronomas da presente coorte identificou apenas um média de 13 variantes por tumor, o que está em acordo com estudos prévios[29,47]. Os aldosteronomas são tumores benignos bem diferenciados com ausência de grandes perdas ou ganhos cromossômicos. Em 2019, Lerário *et al.*[82] investigaram eventos somáticos adicionais em 11 aldosteronomas com variantes patogênicas no *KCNJ5*, que pudessem explicar a proliferação celular e não somente a seceção de aldosterona. Nenhum evento somático possivelmente associado com proliferação ou crescimento tumoral foi identificado[82].

Em relação aos defeitos germinativos, foram identificadas variantes novas nos genes *CACNA1H*, *CACNA1I*, *ATP13A3* e *KCNC4* em pacientes com aldosteronomas sem variantes somáticas nos genes *KCNJ5, ATP1A1, ATP2B3* e *CTNNB1*. O gene *CACNA1H* codifica a subunidade α 1H do canal de cálcio voltagem-dependente do tipo T, $Ca_v3.2$. A variante germinativa p.Pro559Thr em heterozigose no *CACNA1H* altera um aminoácido altamente conservado entre as espécies e é considerada deletéria em mais de três algoritmos de predição *in silico.* Essa variante está localizada no loop I-II do $Ca_v3.2$, região de grande importância para o funcionamento do canal (Figura 16)[67]. Em 2016, Daniil *et al.*[45] identificaram a variante germinativa em heterozigose p.Val1951Glu no *CACNA1H* em uma paciente de 60 anos com aldosteronoma, que teve diagnóstico de HAS aos 48 anos e HP aos 50 anos. A variante p.Val1951Glu está localizada no domínio citoplasmático C-terminal do $Ca_v3.2$ (Figura 16), em uma região possivelmente implicada na ativação

rápida do canal. O estudo funcional da variante p.Val1951Glu mostrou que ela promove ativação do canal $Ca_v3.2$ e aumento da expressão das enzimas HSD3B1 e CYP11B2[45]. Uma única variante germinativa em heterozigose (p.Met1549Val) no *CACNA1H* causa HP familial com início antes de 10 anos[43]. Posteriormente, variantes adicionais no *CACNA1H* (p.Met1549Ile, p.Ser196Leu, p.Val1951Glu e p.Pro2083Leu) foram descritas em pacientes com HP familial diagnosticado após os 20 anos e com padrão de penetrância incompleta[45]. Embora a filha (37 anos) do caso índice seja carreadora da variante p.Pro559Thr e não tenha desenvolvido HP, a mesma tem HAS e a sua mãe teve o diagnóstico de HP aos 56 anos. O estudo funcional da variante p.Pro559Thr no *CACNA1H* está em andamento por meio de uma colaboração internacional.

O gene *CACNA1I* codifica a subunidade α 1I do canal de cálcio voltagem-dependente do tipo T, $Ca_v3.3$. Até o momento, polimorfismos no *CACNA1I* foram associados ao desenvolvimento de esquizofrenia[59]. A variante p.Arg178Cys, identificada neste estudo, é rara e altera um aminoácido altamente conservado entre as espécies, sendo considerada deletéria em mais de três algoritmos de predição *in silico.* A variante p.Arg178Cys altera um importante resíduo arginina no segmento S4 do domínio transmembrana I do $Ca_v3.3$ (Figura 16). Os segmentos S4 são sensores de voltagem e é esperado que essa variante cause alteração do comportamento eletrofisiológico do canal. A variante p.Arg178Cys foi identificada em quatro membros da família: no caso índice com diagnóstico de HAS aos 20 anos e diagnóstico de HP aos 38 anos; na irmã de 50 anos, portadora de HAS desde os 30 anos; e nos dois filhos (26 anos e 24 anos) normotensos. Todos os familiares do caso índice tiveram rastreamento negativo para HP. O estudo funcional da variante

p.Arg178Cys no *CACNA1I* também está em andamento por meio de uma colaboração internacional. Embora seja muito precoce levantar hipóteses antes do estudo funcional, defeitos germinativos em genes codificadores de canais inônicos em pacientes com HP por aldosteronoma podem ter penetrância incompleta e constituírem fatores predisponentes para HAS. O desenvolvimento do aldosteronoma seria decorrente de um segundo evento somático clonal em meio a um *background* genético susceptível.

O gene *KCNC4* codifica o canal de potássio voltagem-dependente $K_v3.4$ e é altamente expresso em glândulas suprarrenais normais (GTEx). Até o momento, nenhum fenótipo foi associado ao *KCNC4*. A variante p.Tyr507Ser do *KCNC4* altera aminoácido altamente conservado entre as espécies e é considerada deletéria em mais de três algoritmos de predição *in silico.* Na segregação familial, o filho do caso índice, carreador da variante p.Tyr507Ser, é normotenso, mas apresentou renina baixa na avaliação inicial de HP. O gene *ATP13A3* codifica uma proteína transmembrana da família de proteínas ATPase do tipo P que transporta uma variedade de cátions. O *ATP13A3* está expresso em glândulas suprarrenais normais (GTEx) e também não foi associado a nenhum fenótipo até o momento. A variante p.Glu52Ala do *ATP13A3* altera aminoácido altamente conservado em domínio proteico e é considerada deletéria em mais de três algoritmos de predição *in silico.* Não foi possível ainda realizar a segregação familial desta variante. Todas as variantes germinativas descritas no presente estudo foram classificadas como VUS pela ACMG.

Em resumo, foram identificadas quatro novas variantes germinativas (VUS) em pacientes com aldosteronomas, sendo uma delas em um gene sabidamente

associado ao fenótipo HP (*CACNA1H*) e as demais em três genes codificadores de canais iônicos, mas que até o momento não foram associados ao HP. Apesar da estratégia inicial de realizar o sequenciamento exômico somente em indivíduos com aldosteronoma sem variantes patogênicas nos genes *KCNJ5, ATP1A1, ATP2B3* e *CTNNB1,* é necessário agora investigar variantes germinativas nos genes *CACNA1H, CACNA1I, ATP13A3* e *KCNC4* em todos os pacientes com HP por aldosteronomas da presente coorte, independente da presença de eventos somáticos já identificados. Além de ampliar a coorte, aguarda-se o estudo funcional para elucidar o papel das variantes germinativas nos genes *CACNA1H, CACNA1I, ATP13A3* e *KCNC4* na patogênese do HP causado por aldosteronomas.

6 CONCLUSÕES

Variantes patogênicas somáticas nos genes já relacionados ao HP (*KCNJ5, ATP1A1, ATP2B3, CTNNB1* e *CACNA1D*) foram identificadas em aproximadamente 55% da presente coorte de aldosteronomas.

As variantes patogênicas somáticas no *KCNJ5* foram identificadas em aproximadamente 45% dos aldosteronomas, com as variantes p.Leu168Arg e p.Gly151Arg apresentando frequência similar.

As variantes patogênicas somáticas no *KCNJ5* foram identificadas mais frequentemente em mulheres jovens com nódulos maiores.

Adicionalmente, a presença de variantes patogênicas somáticas no *KCNJ5* foi um fator preditor independente de remissão da HAS após adrenalectomia em pacientes com aldosteronomas.

Uma nova variante germinativa no *CACNA1H* (p.Pro559Thr) foi identificada em um paciente com aldosteronoma.

A variante germinativa do *CACNA1I* (p.Arg178Cys) foi encontrada em um paciente com aldosteronoma. O *CACNA1I* surge como um novo gene candidato para o HP.

Variantes germinativas em outros genes candidatos (*KCNC4* e *ATP13A3*) foram identificadas em pacientes com HP causado por aldosteronomas.

7 ANEXOS

Anexo A - Artigo de Revisão

review

Diagnosis and management of primary aldosteronism

Leticia A. P. Vilela[1], Madson Q. Almeida[1,2]

ABSTRACT

Primary aldosteronism (PA) is the most common form of secondary hypertension (HTN), with an estimated prevalence of 4% of hypertensive patients in primary care and around 10% of referred patients. Patients with PA have higher cardiovascular morbidity and mortality than age- and sex-matched patients with essential HTN and the same degree of blood pressure elevation. PA is characterized by an autonomous aldosterone production causing sodium retention, plasma renin supression, HTN, cardiovascular damage, and increased potassium excretion, leading to variable degrees of hypokalemia. Aldosterone-producing adenomas (APAs) account for around 40% and idiopathic hyperaldosteronism for around 60% of PA cases. The aldosterone-to-renin ratio is the most sensitive screening test for PA. There are several confirmatory tests and the current literature does not identify a "gold standard" confirmatory test for PA. In our institution, we recommend starting case confirmation with the furosemide test. After case confirmation, all patients with PA should undergo adrenal CT as the initial study in subtype testing to exclude adrenocortical carcinoma. Bilateral adrenal vein sampling (AVS) is the gold standard method to define the PA subtype, but it is not indicated in all cases. An experienced radiologist must perform AVS. Unilateral laparoscopic adrenalectomy is the preferential treatment for patients with APAs, and bilateral hyperplasia should be treated with mineralocorticoid antagonist (spironolactone or eplerenone). Cardiovascular morbidity caused by aldosterone excess can be decreased by either unilateral adrenalectomy or mineralocorticoid antagonist. In this review, we address the most relevant issues regarding PA screening, case confirmation, subtype classification, and treatment. Arch Endocrinol Metab. 2017;61(3):305-12.

Keywords
Primary aldosteronism; resistant hypertension; diagnosis; aldosterone; renin

[1] Unidade de Suprarrenal, Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular – LIM42, Divisão de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, SP, Brasil
[2] Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (Icesp), FMUSP, São Paulo, SP, Brasil

Correspondence to:
Madson Q. Almeida
Unidade de Suprarrenal, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM-42, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 2º andar, Bloco 6
05403-900 – São Paulo, SP, Brasil
madsonalmeida@usp.br

Received on Sept/11/2016
Accepted on May/4/2017

DOI: 10.1590/2359-3997000000274

Hypertension (HTN) affects between 10 to 40% of the general population and is the leading risk fator for premature death in the world (1,2). Robust experimental and clinical evidence implicates mineralocorticoids in the pathogenesis of HTN (3). Most monogenic forms of HTN in humans can be associated to defects in renal sodium balance (4). Several studies demonstrated that elevated aldosterone levels are predictors of adverse outcome in HTN (5), heart failure (6,7), myocardial infarction (8), and renal insufficiency (9).

Primary aldosteronism (PA) is the most common form of secondary HTN with an estimated prevalence of 4% of hypertensive patients in primary care and around 10% of referred patients (10,11). PA is particularly common in patients with resistant HTN, with a prevalence of 14 to 21% (12,13). Resistant HTN is defined as office, or clinic, systolic blood pressure (BP) of ≥ 140 mmHg, diastolic BP of ≥ 90 mmHg, or an elevation of both, on at least 3 antihypertensive medications from different drug classes, preferably including a diuretic (14). PA is the most common curable form of HTN. Because of the adverse cardiovascular effects of excess aldosterone that are independent of high BP levels, patients with PA have higher cardiovascular morbidity and mortality than age- and sex-matched patients with essential HTN and the same degree of BP elevation (15,16) (Table 1).

Table 1. Cardiovascular and metabolic complications in primary aldosteronism (PA) compared to essential hypertension (EH)

	PA (%)	EH (%)	*p*
Cardiovascular events			
Atrial fibrilation (17)	3.9	1.1	0.001
Coronary artery disease (17)	5.7	2.8	0.03
Heart failure (17)	4.1	1.2	0.003
Nonfatal myocardial infarction (17)	4.4	1.7	0.01
Stroke (18)	7.4	3.5	0.006
Metabolic alterations			
Metabolic syndrome (19)	41.1	29.6	0.05
Abnormal glucose metabolism (20)#	22.4	16.8	0.04

Meta analysis.

Copyright© ABEM all rights reserved.

PA is characterized by an autonomous aldosterone production which is inappropriately high for sodium state and is not regulated by angiotensina II or plasma potassium concentrations. This autonomous aldosterone production causes sodium retention, plasma renin supression, HTN, cardiovascular damage, and increased potassium excretion, leading to variable degree of hypokalemia (21). In the largest study of PA prevalence, hypokalemia was identified in 48% of aldosterone-producing adenomas (aldosteronomas) and in 17% of idiopathic hyperaldosteronism (bilateral adrenal hyperplasia) (22). The frequency of PA subtypes and hypokalemia in different cohorts depends on whether PA is routinely screened among hypertensive patients and if adrenal vein sampling (AVS) is available in the specialized center. In general, aldosterone-producing adenomas (APAs) account for around 40% and idiopathic hyperaldosteronism for around 60% of PA cases. APAs are small benign tumors (1-3 cm) originating from the glomerulosa zone, but in few cases can be smaller than 1 cm and diagnosed only if the AVS shows a lateralized aldosterone production. If a patient with PA has an adrenal tumor larger than 4 cm, we should consider the rare possibility of an aldosterone-producing adrenal carcinoma. Other rare causes of PA, accounting for less than 1%, are unilateral adrenal hyperplasia and familial PA, which is discussed elsewhere in this review. In our cohort of 104 PA cases from the Clinics Hospital of Sao Paulo University Medical School, aldosteronomas were diagnosed in 79% and idiopathic hyperaldosteronism in 20% of our cases, suggesting that idiopathic hyperaldosteronism is probably underdiagnosed at our institution. Familial PA type I (glucocorticoid remediable form of PA) was diagnosed in a single patient. Hypokalemia was identified in 79% of patients with aldosteronomas and in 68% of those with idiopathic hyperaldosteronism. The case detection of PA is recommended in the conditions listed in Table 2, as addressed in the 2016 Endocrine Society Clinical Practice Guideline of PA (23).

SCREENING AND CASE CONFIRMATION

The aldosterone-to-renin ratio is the most sensitive test that screens for PA. Immunometric assays can be employed to measure renin either by testing for plasma renin activity (PRA) or for direct renin concentration (DRC). Currently, most comercial kits measure direct renin concentration; however, the aldosterone-to-renin ratios used in PA screening were determined using PRA. Because the aldosterone-to-renin ratio is more dependent on renin, assays should be sensitive enough to detect PRA levels of 0.2-0.3 ng/mL/h (or DRC of 2 mU/L). When measuring plasma aldosterone (A) in ng/dL and PRA in ng/mL/h, the most commonly adopted A/PRA cut-off for PA screening is 30 (21). In the presence of low renin levels, the aldosterone-to-renin ratio may be elevated even when aldosterone is not high. Then, a minimum aldosterone concentration of 15 ng/dL has been proposed as part of the screening criteria. In our institution, 6% of PA patients had aldosterone levels between 12.5 and 15 ng/dL. Because of that, we use the minimum aldosterone level of 12.5 ng/dL to proceed with PA investigation (Figure 1). In a recently introduced and already commonly used automated DRC assay (DiaSorin, LIAISON XL instrument), we can use the conversion factor of 12 (DRC/12 = PRA) to calculate the A/PRA ratio (21). A recent study validated this automated chemiluminescent assay for DRC and aldosterone. Using DRC (mU/L), the A/DRC ratio of 2.1 had a sensitivity of 92%, a specificity of 92%, and negative predictive value of 99% to PA diagnosis. When using the A/DRC of 3.3, sensitivity was 84% and specificity was 96% for PA diagnosis (24). Although we need more studies to validate the aldosterone-to-renin ratio using

Table 2. Recommendations for primary aldosteronism (PA) screening in clinical setting

Hypertension and spontaneous or diuretic-induced hypokalemia
Hypertension and adrenal incidentaloma
BP above 150/100 on three separate measurements obtained on different days
Hypertension (BP ≥ 140/90) resistant to three conventional antihypertensive drugs (preferably including a diuretic)
Controlled BP (< 140/90) on four or more antihypertensive drugs
Hypertension and sleep apnea
Hypertension and a family history of early onset hypertension or cerebrovascular accident at a young age (< 40 years)
All hypertensive first-degree relatives of patients with PA

BP: blood pressure.

Copyright© ABEM All rights reserved.

DRC, it seems that A/DRC between 2 and 3 should be equivalent to A/PRA ratio of 30.

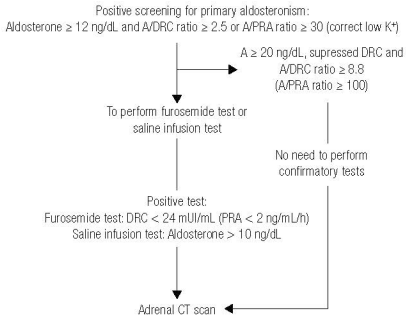


Figure 1. Algorithm for the detection and confirmation of primary aldosteronism.

A: aldosterone; DRC: direct renin concentration; PRA: plasma renin activity; CT: computed tomography.

In order to increase sensitivity, aldosterone and renin samples should be collected in the morning after patients have been out of bed for at least 2 hours, and usually after they have been seated for 5-15 minutes. Ideally, patients should have unrestricted dietary salt intake before testing and should be potassium-replete (21). It should be emphasized that mineralocorticoid antagonists (spironolactone or eplerenone) and other types of diuretics should be withdrawn for at least 4 weeks before testing. When it is not clinically possible to withdraw mineralocorticoid antagonists or diuretics, suppressed renin levels associated with high aldosterone levels strongly suggest a PA diagnosis.

In many cases (excluding mineralocorticoid antagonist or diuretic treatment), the aldosterone-to-renin ratio can be confidently interpreted despite the effect of continued medications, thus avoiding delay and allowing the patient to proceed directly to confirmatory testing. Very often, a washout of all interfering antihypertensive medications is not feasible in patients with severe HTN. Then, the aldosterone-to-renin ratio should be interpreted in light of the potential confounding factors (Table 3) (21). In premenopausal ovulating women, false positives can occur during the luteal phase, but only if renin is measured as DRC. Similarly, the use of oral contraceptives is associated with a false positive screening for PA, but only if renin is measured as DRC (25). Then, if premenopausal women have a positive screening for PA, we can repeat the test without oral contraceptives (if is the case) or during the follicular phase, or even proceed with confirmatory testing.

Table 3. Factors that may interfere with screening for primary aldosteronism

	Aldosterone	DRC	Aldosterone/ DRC
β-Adrenergic blockers	↓	↓	↑ (FP)
Central agonists (clonidine, α-methyldopa)	↓	↓	↑ (FP)
Diuretics	→↑	↑	↓ (FN)
Ca^2 blockers (DHPs)	→↑	↑	↓ (FN)
ACE inhibitors, ARBs	↓	↑	↓ (FN)
Advancing age	↓	↓	↑ (FP)
Premenopausal women (*vs.* Male)	→↑	↓	↑ (FP)

DRC: direct renin concentration; FP: false positive; FN: false negative; ARBs: angiotensin II type 1 receptor blockers; DHP: dihydropyridines.

In the Endocrine Division of the Clinics Hospital of University of Sao Paulo Medical School, we follow the algorithm for detection and confirmation of PA shown in Figure 1. First, potassium levels should be normal to adequately interpret the aldosterone-to-renin ratio. If a patient has aldosterone levels ≥ 12.5 ng/dL and A/PRA (ng/mL/h) ratio ≥ 30 or A/DRC (mU/L) ratio ≥ 2.5, the PA screening is considered positive. In our cohort, all PA patients had the A/PRA ratio above 30 or A/DRC ratio above 2.5 when DRC was determined.

As mentioned before, we always recommend the withdrawn of mineralocorticoid antagonists and diuretics for at least 4 weeks when clinically feasible. Otherwise, we perform the PA screening with all other antihypertensive medications. If aldosterone levels are < 20 ng/dL and PRA or DRC are not suppressed (but within the lower normal range), we recommend the replacement of the antihypertensive medications with verapamil, hydralazine, and α-1 blockers (doxazosin or prazosin). Clonidine can be added if a fourth medication is needed.

If a patient has aldosterone levels ≥ 20 ng/dL and suppressed PRA or DRC levels, there is no need for further confirmatory testing and we can proceed with a computed tomography (CT) scan to investigate PA etiology (26). In other cases, we perform confirmatory testing to exclude false positives (Figure 1). There are several confirmatory tests and the current literature

Copyright©AEM All rights reserved.

does not identify a "gold standard" confirmatory test for PA (21). Specialized centers choose their preferred confirmatory test based on their own experience. We suggest starting case confirmation with the furosemide test. In our experience, the furosemide test had an accuracy higher than 90% in diagnosing PA. If the furosemide test is not conclusive and the patient doesn't have contraindication for sodium loading, we perform the saline infusion test. The main problem with the saline infusion test is the volume overload in a short period performed in patients with severe/resistant HTN or congestive heart failure. Currently, we only use the captopril test as a first option in patients with very impaired renal function, because of its too low reproducibility. Before performing any confirmatory test, we should check to see if potassium levels are normal and should correct hypokalemia. Below is detailed description of the three confirmatory tests mentioned above:

- **Furosemide test:** Patients receive furosemide 40 mg iv and stay in an upright position for 2h, starting at 8-9.30 AM. Blood samples for PRA or DRC, aldosterone, and potassium are drawn at time zero and after 2 h. PRA < 2 ng/mL/h (or DRC < 24 mU/L) confirms the PA diagnosis (26). Although patients with essential hypertension can present low renin levels, plasma renin activity (PRA) increases above 2 ng/mL/h after furosemide injection.
- **Saline infusion test:** Patients stay in the recumbent position for at least 1 h before and during the infusion of 2L of 0.9% saline iv over 4h, starting at 8-9.30 AM. Blood samples for aldosterone, PRA or DRC, and potassium are drawn at time zero and after 4 h. Aldosterone levels > 10 ng/dL confirm the diagnosis of PA, and aldosterone < 5 ng/dL excludes the diagnosis. Aldosterone levels between 5 and 10 ng/dL are considered indeterminate, although a cutoff of 6.8 ng/dL has been found to have the best trade-off between sensitivity and specificity (27).
- **Captopril test:** Patients receive 50 mg of captopril orally after sitting or standing for at least 1 h. Blood samples are drawn for measurement of PRA or DRC, plasma aldosterone, and cortisol at time zero and at 1h and 2h after captopril, with the patient remaining seated during this period. Plasma aldosterone is normally suppressed by captopril (> 30%). In patients with PA, aldosterone level remains elevated and renin remains suppressed (26). APAs can be abnormally regulated by ACTH. Then, if cortisol levels decrease during the test, we should diminish the percentage of cortisol variation from aldosterone variation to analyze only the captopril effect.

SUBTYPE CLASSIFICATION

All patients with PA should undergo adrenal CT as the initial study in subtype testing to exclude adrenocortical carcinoma. Magnetic resonance imaging has no advantage over CT in subtype evaluation of PA (21). Proper distinction between APAs and bilateral hyperplasia is crucial, because the former is treated by adrenalectomy and the latter by mineralocorticoid receptor antagonists. For the diagnosis of these two subtypes, adrenal CT scan or bilateral adrenal vein sampling (AVS) is used. Adrenal CT has several limitations, because its accuracy for diagnosing APAs is limited. CT scan can reveal normal-appearing adrenals, but the patient can have a very small APA below the detection limit of CT. Moreover, nonfunctioning unilateral adrenal adenomas are not uncommon, especially in older patients (> age 40 years), and an APA can be incorrectly diagnosed in a patient with bilateral adrenal hyperplasia and normal-appearing adrenal (28). In a different situation, bilateral adrenal nodules might be interpreted as bilateral hyperplasia on the basis of CT findings, but the patient can have an APA and an adrenal incidentaloma in the contralateral side (Figure 2).

The 2016 Endocrine Society Clinical Practice Guideline of PA recommends not to perform AVS in younger patients (< 35 years) with spontaneous hypokalemia, marked aldosterone excess, and unilateral adrenal lesions with radiological features consistent with a cortical adenoma on adrenal CT scan (21). In this situation, the probability of an adrenal incidentaloma is very low. At our institution, we don't consider the age of PA diagnosis to indicate AVS but the age of HTN diagnosis, because the median time of HTN before PA diagnosis is 14 years. In other words, most of patients with APA had been diagnosed with HTN before 35 or 40 years, but PA was only diagnosed after 40 years. This trend reflects the fact that PA screening is very delayed in our country. Based on this observation, we do not recommend AVS in patients with severe PA (A ≥ 20 ng/dL, hypokalemia and suppressed DRC or PRA) with HTN diagnosed before 40 years and unilateral adrenal lesion (> 1cm) and normal contralateral adrenal on adrenal CT scan.

Copyright© AEDM all rights reserved.

In a recent randomised controlled trial (SPARTACUS TRIAL), patients with PA were randomly assigned to undergo either adrenal CT or AVS to determine the presence of APA (with subsequent treatment consisting of adrenalectomy) or bilateral adrenal hyperplasia (subsequent treatment with mineralocorticoid receptor antagonists) (29). Of the 184 patients that completed follow-up, 92 received CT-based treatment (46 adrenalectomy and 46 mineralocorticoid receptor antagonist) and 92 received AVS-based treatment (46 adrenalectomy and 46 mineralocorticoid receptor antagonist). The persistence of PA was higher in patients who received CT-based treatment (20%) compared to patients who received AVS-based treatment (11%), but this difference was not statistically significant (29). This important trial showed that AVS should not be recommended for all PA patients, but it did not rule out the importance of AVS in PA subtype classification, particularly in cases with bilateral lesions or normal-appearing adrenal. Although the SPARTACUS trial is the first randomized study to compare CT- *vs.* AVS-based approaches, we need to reanalyze this issue in larger cohorts.

AVS should be performed under a condition of suppressed renin, because increased renin levels by diuretics or mineralocorticoid antagonists can lead to the stimulation of the contralateral adrenal to an APA, and unilateral PA might be misclassified as bilateral. Therefore, it is important to check if DRC or PRA is suppressed before performing AVS. An experienced radiologist is required to perform AVS. AVS includes catheterization and collecting blood samples from the right and left adrenal veins and from the inferior vena cava to measure cortisol and aldosterone. The right adrenal vein may be especially difficult to catheterize because it is short and enters the inferior vena cava at an acute angle (30). We recently started to measure serum cortisol during the AVS procedure to evaluate the successful catheterization of the right adrenal vein. Currently, our rate of successful catheterization is 80%. This strategy has been previously employed to improve successful catheterization (31).

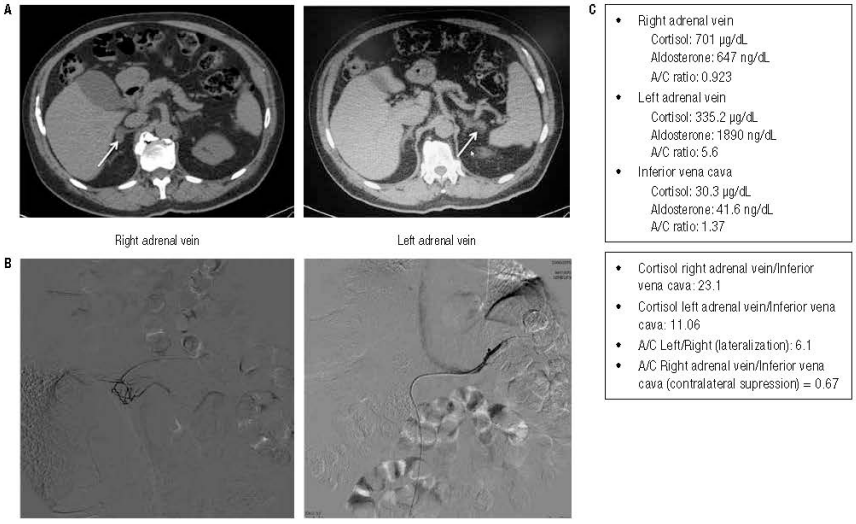


Figure 2. A male patient, 69 years, with resistent hypertension for 30 years, diagnosed with PA. Hormonal data: aldosterone (A) = 24.4 ng/dL; DRC < 1.6 mU/mL (PRA 0.13); A/DRC ratio = 15.25; A/PRA ratio = 188. (**A**) Adrenal CT showing a 1.8 cm nodule at right adrenal gland and a 1.2 cm nodule at left adrenal gland. (**B**) Fluoroscopic imaging from AVS. (**C**) Analysis of AVS sampling showed lateralization of aldosterone production to the left side. Then, this patient had an adrenal incidentaloma on the right side and an aldosterone-producing adenoma on the left side. The patient underwent left adrenal adrenalectomy and had biochemical cure of PA.

A: aldosterone; C: cortisol; A/C: aldosterone to cortisol ratio; PA: primary aldosteronism; AVS: adrenal vein sampling.

Copyright© AE&M all rights reserved.

We perform AVS under cosyntropin infusion with sequential bilateral AVS. The use of continuous cosyntropin infusion during AVS minimizes stress-induced fluctuations in aldosterone secretion (since aldosterone can be regulated by ACTH in APAs). In addition, the cosyntropin infusion maximizes the gradient of cortisol from adrenal vein to inferior vena cava, confirming the successful sampling of the adrenal vein (32). To determine the aldosterone lateralization and contralateral suppression, we use the cortisol-corrected aldosterone ratio (aldosterone divided by cortisol level in its respective vein; A/C) to correct for dilution effects. To evaluate if the nondominant adrenal (not oversecreting aldosterone) is suppressed, we calculate the contralateral suppression (defined as the A/C ratio from the low-side to inferior vena cava). See the AVS protocol in the Clinics Hospital of Sao Paulo University Medical School below: 1) Dilute cosyntropin (250 µg) in 250 mL of saline 0.9% and start 50 mL/h (30 min before AVS); 2) Collect blood for aldosterone and cortisol measurements from right and left adrenal veins and from inferior vena cava; 3) Determine cortisol ratio between adrenal veins and the periphery (if the ratio is > 5 on each side, the catheterization was successful); 4) Determine A/C ratio to evaluate lateralization. We should calculate the A/C ratio from high-side to low-side. A ratio of more than 4:1 indicates unilateral aldosterone excess. A ratio of less than 3:1 suggests bilateral aldosterone hypersecretion. With these cutoffs, AVS for detecting unilateral aldosterone hypersecretion has a sensitivity of 95% and specificity of 100%; 5) If the lateralization ratio is between 3:1 and 4:1, the AVS is undetermined. But if contralateral suppression is < 0.67, it suggests a lateralization to the higher side (33). In Figure 2, we demonstrate a clinical case in which AVS was recommended and very useful in the subtype definition.

If a patient with PA has an APA ≥ 2.5 cm or macronodular bilateral hyperplasia, screening for subclinical Cushing is recommended: 1 mg dexamethasone suppression test, ACTH, 24h urinary free cortisol, salivar cortisol and dehydroepiandrosterone sulfate.

FAMILIAL PRIMARY ALDOSTERONISM

In patients with an onset of confirmed PA earlier than 20 years of age, and in those who have a family history of PA or stroke at a young age (< 40 years), the Endocrine Society Clinical Practice Guideline of PA suggests genetic testing for familial PA type I (glucocorticoid remediable aldosteronism) and type III (caused by *KCNJ5* germline mutations) (21) (Table 4).

Table 4. Familial forms of primary aldosteronism

	Type I	Type III	Type III
Cause	Hybrid *CYP11B1/ CYP11B2*	Unknown	Germline *KCNJ5*
Transmission	Autosomal dominant	Autosomal dominant	Autosomal dominant
Genetic diagnosis	Long PCR	No	*KCNJ5* sequencing
Hypertension onset	Very often < 20 years	Adulthood	Very often < 10 years
Hypertension severity	Severe to resistant hypertension (normal BP is rare)	Stage 1 to resistant hypertension (normal BP is not often)	Stage 3 to resistant hypertension
Hypokalemia	Rare	Not often	Very often
Aldosterone after dexamethasone	< 4 ng/dL	> 4 ng/dL	> 4 ng/dL
Adrenal CT	Normal	Unilateral or bilateral lesions	Bilateral macronodular hyperplasia
Treatment	Dexamethasone or mineralocorticoid antagonist	Unilateral adrenalectomy or mineralocorticoid antagonist	Bilateral adrenalectomy or mineralocorticoid antagonist

BP: blood pressure. CT: computed tomography.

Familial PA type I is caused by an unequal crossover between the genes *CYP11B1* (which encodes steroid 11α-hydroxylase) and *CYP11B2* (which encodes aldosterone synthase) (34,35). The resulting hybrid gene encodes an enzyme chimera with aldosterone synthase activity that is expressed in the adrenal zona fasciculata under control of ACTH instead of angiotensin II. Patients with familial PA type I show suppressed plasma aldosterone levels (< 4 ng/dL) after dexamethasone (0.5 mg every 6h during 48 or 72h) (36). Familial PA type I is treated with dexamethasone in adults (0.125-0.25 mg/d). If additional drugs are necessary to control BP or normalize renin levels, mineralocorticoid antagonist can be added (37,38).

Familial PA type II is clinically and biochemically indistinguishable from sporadic forms. Prevalence was reported to be as high as 6% in a large population with PA (39). Familial PA type II is diagnosed when at least two first-degree members of the same family have confirmed PA (APA or bilateral hyperplasia). The molecular basis of FH-II is still unknown, but genetic analyses demonstrated a link with chromosome 7p22 (40).

Copyright©AEDM all rights reserved.

Familial PA type III is caused by mutations in the *KCNJ5* gene encoding the potassium channel Kir 3.4, resulting in increased sodium conductance and cell depolarization (41). Familial PA type III is characterized by severe HTN in early childhood associated with PA, hypokalemia, and macronodular bilateral hyperplasia (42). Because of the HTN severity, bilateral adrenalectomy may be needed to control BP (36).

TREATMENT

Cardiovascular morbidity caused by aldosterone excess can be decreased by either unilateral adrenalectomy or mineralocorticoid antagonist (43). Overall reduction of left ventricular mass has been demonstrated to be similar in unilateral adrenalectomy or mineralocorticoid antagonist treatment at the end of a 6.4 year follow-up (44). However, a study comparing both treatments in terms of cardiovascular mortality remains to be conducted.

Unilateral laparoscopic adrenalectomy is indicated for patients with APAs. If the patient with an APA is unable or unwilling to undergo surgery, medical treatment including a mineralocorticoid antagonist is recommended. Before unilateral adrenalectomy, the patient should be treated with mineralocorticoid antagonist in order to normalize potassium levels and renin levels, avoiding hyporeninemic hypoaldosteronism in the postoperative period. In addition, we should measure sodium, potassium, aldosterone, and renin levels in the first week after surgery to monitor treatment response. After unilateral adrenalectomy, HTN is cured in about 50% (range of 35-80%) of patients with APA (21). Primary HTN in first-degree relatives and a longer duration of HTN before diagnosing PA are associated with low rates of HTN cure after unilateral adrenalectomy (45,46).

Bilateral hyperplasia should be treated with mineralocorticoid antagonist (spironolactone or eplerenone). In Brazil, only spironolactone is available for treatment. Spironolactone (50-400 mg/d) has been the agent of choice in the medical treatment of PA, reducing BP levels as well as the need for antihypertensive drugs (47). The starting dose for spironolactone is 50 mg in a single dose. The dose should be increased by 50 mg each 3-4 weeks. During treatment, we aim to control blood pressure and to normalize potassium and renin levels.

Since spironolactone antagonizes androgen receptor and inhibits androgen production, it promotes dose-dependent gynecomastia and loss of libido in men. In females, spironolactone can cause menstrual irregularities and breast tenderness and enlargement (48). To avoid or decrease side effects, amiloride or a small dose of thiazide diuretic can be used to avoid a higher dose of spironolactone. In patients with stage III chronic kidney disease or in older patients, mineralocorticoid antagonist should be administered with caution because of the risk of hyperkalemia and worsening renal function.

Eplerenone is a selective mineralocorticoid antagonist without antiandrogen effects and, therefore, is less associated with endocrine side effects and given twice daily (49). Despite its better tolerability, eplerenone has a higher cost and can be less effective than spironolactone to lower BP in the medical treatment of PA (50). In the next years, it is likely that new mineralocorticoid antagonists and selective aldosterone synthase inhibitors will be available to treat PA (21).

Disclosure: no potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

1. Murray CJ, Lopez AD. Measuring the global burden of disease. N Engl J Med. 2013;369(5):448-57.
2. Egan BM, Zhao Y, Axon RN. US trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension, 1988-2008. JAMA. 2010;303(20):2043-50.
3. Stewart PM. Mineralocorticoid hypertension. Lancet. 1999; 353(9161):1341-7.
4. Lifton RP. Molecular genetics of human blood pressure variation. Science. 1996;272(5262):676-80.
5. Vasan RS, Evans JC, Larson MG, Wilson PW, Meigs JB, Rifai N, et al. Serum aldosterone and the incidence of hypertension in nonhypertensive persons. N Engl J Med. 2004;351(1):33-41.
6. Guder G, Bauersachs J, Frantz S, Weismann D, Allolio B, Ertl G, et al. Complementary and incremental mortality risk prediction by cortisol and aldosterone in chronic heart failure. Circulation. 2007;115(13):1754-61.
7. Tsutamoto T, Sakai H, Tanaka T, Fujii M, Yamamoto T, Wada A, et al. Comparison of active renin concentration and plasma renin activity as a prognostic predictor in patients with heart failure. Circ J. 2007;71(6):915-21.
8. Beygui F, Collet JP, Benoliel JJ, Vignolles N, Dumaine R, Barthelemy O, et al. High plasma aldosterone levels on admission are associated with death in patients presenting with acute ST-elevation myocardial infarction. Circulation. 2006;114(24):2604-10.
9. Tylicki L, Larczynski W, Rutkowski B. Renal protective effects of the renin-angiotensin-aldosterone system blockade: from evidence-based approach to perspectives. Kidney Blood Press Res. 2005;28(4):230-42.
10. Hannemann A, Wallaschofski H. Prevalence of primary aldosteronism in patient's cohorts and in population-based studies--a review of the current literature. Horm Metab Res. 2012;44(3):157-62.
11. Plouin PF, Amar L, Chatellier G. Trends in the prevalence of primary aldosteronism, aldosterone-producing adenomas, and surgically correctable aldosterone-dependent hypertension. Nephrol Dial Transplant. 2004;19(4):774-7.

Copyright© AEDM All rights reserved.

12. Douma S, Petidis K, Doumas M, Papaefthimiou P, Triantafyllou A, Kartali N, et al. Prevalence of primary hyperaldosteronism in resistant hypertension: a retrospective observational study. Lancet. 2008;371(9628):1921-6.
13. Calhoun DA, Nishizaka MK, Zaman MA, Thakkar RB, Weissmann P. Hyperaldosteronism among black and white subjects with resistant hypertension. Hypertension. 2002;40(6):892-6.
14. Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD, et al. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. Circulation. 2008;117(25):e510-26.
15. Milliez P, Girerd X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. J Am Coll Cardiol. 2005;45(8):1243-8.
16. Stowasser M, Sharman J, Leano R, Gordon RD, Ward G, Cowley D, et al. Evidence for abnormal left ventricular structure and function in normotensive individuals with familial hyperaldosteronism type I. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90(9):5070-6.
17. Savard S, Amar L, Plouin PF, Steichen O. Cardiovascular complications associated with primary aldosteronism: a controlled cross-sectional study. Hypertension. 2013;62(2):331-6.
18. Mulatero P, Monticone S, Bertello C, Viola A, Tizzani D, Iannaccone A, et al. Long-term cardio- and cerebrovascular events in patients with primary aldosteronism. J Clin Endocrinol Metab. 2013;98(12):4826-33.
19. Fallo F, Veglio F, Bertello C, Sonino N, Della Mea P, Ermani M, et al. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in primary aldosteronism. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(2):454-9.
20. Chen W, Li F, He C, Zhu Y, Tan W. Elevated prevalence of abnormal glucose metabolism in patients with primary aldosteronism: a meta-analysis. Ir J Med Sci. 2014;183(2):283-91.
21. Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, Shibata H, et al.The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab. 2016;101(5):1889-916.
22. Rossi GP, Bernini G, Caliumi C, Desideri G, Fabris B, Ferri C, et al. A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients. J Am Coll Cardiol. 2006;48(11):2293-300.
23. Funder JW, Carey RM, Fardella C, Gomez-Sanchez CE, Mantero F, Stowasser M, et al. Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline. J Clin Endocrinol Metab. 2008;93(9):3266-81.
24. Rossi GP, Ceolotto G, Rossitto G, Seccia TM, Maiolino G, Berton C, et al. Prospective validation of an automated chemiluminescence-based assay of renin and aldosterone for the work-up of arterial hypertension. Clin Chem Lab Med. 2016;54(9):1441-50.
25. Ahmed AH, Gordon RD, Taylor PJ, Ward G, Pimenta E, Stowasser M. Effect of contraceptives on aldosterone/renin ratio may vary according to the components of contraceptive, renin assay method, and possibly route of administration. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96(6):1797-804.
26. Nanba K, Tamanaha T, Nakao K, Kawashima ST, Usui T, Tagami T, et al. Confirmatory testing in primary aldosteronism. J Clin Endocrinol Metab. 2012;97(5):1688-94.
27. Rossi GP, Belfiore A, Bernini G, Desideri G, Fabris B, Ferri C, et al. Prospective evaluation of the saline infusion test for excluding primary aldosteronism due to aldosterone-producing adenoma. J Hypertens. 2007;25(7):1433-42.
28. Kloos RT, Gross MD, Francis IR, Korobkin M, Shapiro B. Incidentally discovered adrenal masses. Endocr Rev. 1995;16(4):460-84.
29. Dekkers T, Prejbisz A, Kool LJ, Groenewoud HJ, Velema M, Spiering W, et al. Adrenal vein sampling versus CT scan to determine treatment in primary aldosteronism: an outcome-based randomised diagnostic trial. Lancet Diabetes Endocrinol. 2016;4(9):739-46.
30. Doppman JL, Gill JR, Jr. Hyperaldosteronism: sampling the adrenal veins. Radiology. 1996;198(2):309-12.
31. Yoneda T, Karashima S, Kometani M, Usukura M, Demura M, Sanada J, et al. Impact of New Quick Gold Nanoparticle-Based Cortisol Assay During Adrenal Vein Sampling for Primary Aldosteronism. J Clin Endocrinol Metab. 2016;101(6):2554-61.
32. Rossi GP, Barisa M, Allolio B, Auchus RJ, Amar L, Cohen D, et al. The Adrenal Vein Sampling International Study (AVIS) for identifying the major subtypes of primary aldosteronism. J Clin Endocrinol Metab. 2012;97(5):1606-14.
33. El Ghorayeb N, Mazzuco TL, Bourdeau I, Mailhot JP, Zhu PS, Therasse E, et al. Basal and Post-ACTH Aldosterone and Its Ratios Are Useful During Adrenal Vein Sampling in Primary Aldosteronism. J Clin Endocrinol Metab. 2016;101(4):1826-35.
34. Sutherland DJ, Ruse JL, Laidlaw JC. Hypertension, increased aldosterone secretion and low plasma renin activity relieved by dexamethasone. Can Med Assoc J. 1966;95(22):1109-19.
35. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S, et al. A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. Nature. 1992;355(6357):262-5.
36. Mulatero P, Monticone S, Rainey WE, Veglio F, Williams TA. Role of KCNJ5 in familial and sporadic primary aldosteronism. Nat Rev Endocrinol. 2013;9(2):104-12.
37. Dluhy RG, Anderson B, Harlin B, Ingelfinger J, Lifton R. Glucocorticoid-remediable aldosteronism is associated with severe hypertension in early childhood. J Pediatr. 2001;138(5):715-20.
38. Dluhy RG, Lifton RP. Glucocorticoid-remediable aldosteronism. J Clin Endocrinol Metab. 1999;84(12):4341-4.
39. Pallaufa A, Schirpenbach C, Zwermann O, Fischer E, Morak M, Holinski-Feder E, et al. The prevalence of familial hyperaldosteronism in apparently sporadic primary aldosteronism in Germany: a single center experience. Horm Metab Res. 2012;44(3):215-20.
40. Lafferty AR, Torpy DJ, Stowasser M, Taymans SE, Lin JP, Huggard P, et al. A novel genetic locus for low renin hypertension: familial hyperaldosteronism type II maps to chromosome 7 (7p22). J Med Genet. 2000;37(11):831-5.
41. Scholl UI, Nelson-Williams C, Yue P, Grekin R, Wyatt RJ, Dillon MJ, et al. Hypertension with or without adrenal hyperplasia due to different inherited mutations in the potassium channel KCNJ5. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(7):2533-8.
42. Geller DS, Zhang J, Wisgerhof MV, Shackleton C, Kashgarian M, Lifton RP. A novel form of human mendelian hypertension featuring nonglucocorticoid-remediable aldosteronism. J Clin Endocrinol Metab. 2008;93(8):3117-23.
43. Rossi GP, Bolognesi M, Rizzoni D, Seccia TM, Piva A, Porteri E, et al. Vascular remodeling and duration of hypertension predict outcome of adrenalectomy in primary aldosteronism patients. Hypertension. 2008;51(5):1366-71.
44. Catena C, Colussi G, Lapenna R, Nadalini E, Chiuch A, Gianfagna P, et al. Long-term cardiac effects of adrenalectomy or mineralocorticoid antagonists in patients with primary aldosteronism. Hypertension. 2007;50(5):911-8.
45. Celen O, O'Brien MJ, Melby JC, Beazley RM. Factors influencing outcome of surgery for primary aldosteronism. Arch Surg. 1996;131(6):646-50.
46. Sawka AM, Young WF, Thompson GB, Grant CS, Farley DR, Leibson C, et al. Primary aldosteronism: factors associated with normalization of blood pressure after surgery. Ann Intern Med. 2001;135(4):258-61.
47. Wambach G, Helber A, Bonner G, Hummerich W, Meurer KA, Kaufmann W. [Spironolactone in essential hypertension associated with abnormal aldosterone regulation and in Conn's syndrome (author's transl)]. Dtsch Med Wochenschr. 1980;105(18):647-51.
48. Jeunemaitre X, Chatellier G, Kreft-Jais C, Charru A, DeVries C, Plouin PF, et al. Efficacy and tolerance of spironolactone in essential hypertension. Am J Cardiol. 1987;60(10):820-5.
49. Burgess ED, Lacourciere Y, Ruilope-Urioste LM, Oparil S, Kleiman JH, Krause S, et al. Long-term safety and efficacy of the selective aldosterone blocker eplerenone in patients with essential hypertension. Clin Ther. 2003;25(9):2388-404.
50. Parthasarathy HK, Menard J, White WB, Young WF, Jr., Williams GH, Williams B, et al. A double-blind, randomized study comparing the antihypertensive effect of eplerenone and spironolactone in patients with hypertension and evidence of primary aldosteronism. J Hypertens. 2011;29(5):980-90.

Copyright© ABEM all rights reserved.

Anexo B - Protocolo do Cateterismo das Veias Suprarrenais

1 - Agendamento: Marcar sempre as quintas com a Dra. Aline Cristine Barbosa. Agendar o cateterismo com 30 dias de antecedência e informar ao Dr. Madson Almeida (celular: 11 98154-9911) para que a compra da ampola de cortrosina (não fornecida pelo HCFMUSP) seja solicitada. Sete dias antes da data agendada, confirmar para o Dr. Madson o agendamento do cateterismo para que o mesmo informe ao Laboratório de Hormônios sobre o envio das amostras na referida data.

2 - Início do procedimento: O cateterismo não deve começar após as 12h para que as amostras não sejam entregues no laboratório após as 16h.

3 - Marcação dos tubos: O residente responsável pelo caso deve levar os tubos a serem utilizados já devidamente etiquetados:

- Dosagem de cortisol plasmático rápido para avaliar adequação da cateterização da veia suparrenal direita (VSD): um tubo de tampa roxa com EDTA com etiqueta marcada **VSD e Periferia;**
- Dosagem de cortisol e aldosterona em soro da VSD, veia suprarrenal esquerda (VSE) e da veia cava inferior (VCI): 2 tubos de plástico com gel de tampa vermelha para a **VSD**, 2 tubos para a **VSE** e 2 tubos para a **VCI**.

4 – Estímulo com cortrosina: Diluir 250 µg de cortrosina em 250 mL de SF 0,9% e infundir 50-100 ml/hora, com início 30 minutos antes do cateterismo e durante todo o exame. A retirada da ampola de cortosina deve ser combinada com a enfermeira da Endocrinologia (Maria Tereza dos Santos Carvalho) na semana da realização do cateterismo (ligar no ramal 6624 no período da 8-11h).

5 – Dosagem de cortisol plasmático rápida: Após a cateterização da VSD, devemos coletar da VSD e VCI um tubo de tampa roxa com EDTA para dosagem de cortisol rápida e 2 tubos de plástico com gel de tampa vermelha para dosagem de cortisol e aldosterona séricos. Os tubos de tampa roxa etiquetados com VSD e VCI serão levados até o Laboratório de Hormônios (PAMB 2 andar, Bloco 6). No LIM42, a funcionária Neide Alves ou Poline recepcionará as amostras para fazer a centrifugação. Após a centrifugação, a funcionária Márcia Ester ou Luciana Leopoldino fará a análise e informará o resultado ao residente. Esse processo dura aprox. 30 min. Enquanto aguarda o resultado, a radiologista intervencionista prossegue com a cateterização da VSE e coleta de um tubo de plástico com gel de tampa vermelha para dosagem de cortisol e aldosterona séricos. Se a relação do cortisol na VSD/VCI for ≥5, a cateterização da VSD foi adequada e o cateterismo é encerrado. Após o final do cateterismo, o residente encaminhará os tubos de plástico com gel de tampa

vermelha etiquetados com VSD, VSE e VCI para o Laboratório de Hormônios. Se a relação do cortisol na VSD/VCI for <5, a cateterização da VSD foi inadequada e a radiologista intervencionista realizará mais uma tentativa de cateterização com coleta de sangue para dosagem de cortisol rápido (repetindo o processo).

6 – Interpretação do resultado:

- Após estímulo com ACTH, a relação do cortisol da VSD ou E/VCI deve ser ≥5;
- Determinar o quociente aldosterona/cortisol (aldosterona normalizada);
- **Lateralização:** gradiente ≥4 entre as determinações da duas veias suprarrenais, sendo que no lado não dominante a aldosterona é menor ou igual à da veia cava inferior;
- **Bilateralidade:** gradiente entre as suprarrenais é <3 e a relação de aldosterona normalizada das veias suprarrenais com a veia cava inferior é ≥1;

Um gradiente entre 3 e 4 é geralmente inconclusivo, mas pode ser conclusivo se a relação da aldosterona normalizada contralateral/VCI <0,5, indicando uma supressão contralateral.

Anexo C - Variantes patogênicas somáticas identificadas em aldosteronomas

Gene	Variantes patogênicas	Referência
KCNJ5	p.Gly151Arg p.Leu168Arg	Choi *et al.*[29]
	p.Thr158Ala	Mulatero *et al.*[83]
	p.Ile157del	Murthy *et al.*[84]
	p.Trp126Arg	Williams *et al.*[85]
	p.Glu145Gln p.Arg115Trp p.Glu246Gly	Cheng *et al.*[86]
	p.Phe154Cys p.Ile150_Gly151del_InsMet p.Ser143_Ile144del_InsAla	Scholl *et al.*[87]
	p.Ala139_Phe142dup	Hardege *et al.*[88]
ATP1A1	p.Leu104Arg, p.Val332Gly p.Phe100_Leu104del	Beuschlein *et al.*[47]
	p.Glu960_Ala963del	Azizan *et al.*[48]
	p.Gly99Arg	Williams *et al.*[85]
	p.Met102_Leu103del	Zheng *et al.*[63]
	p.Met102_Ile106del p.Leu103_Leu104del p.Phe959_Glu961del p.Glu960_Leu964del p.Phe956_Glu961del	Åkerström *et al.*[89]
ATP2B3	p.Leu425_426del p.Val426_427del	Beuschlein *et al.*[47]
	p.Val424_Leu425del	Fernandes-Rosa *et al.*[46]
	p.Ala428_Val429del	Dutta *et al.*[90]
	p.Val426_Val429del	Åkerström *et al.*[89]
	p.Val422_Val426del_InsSerThrLeu	Zheng *et al.*[63]
	p.Ala428_Leu433del_InsGlyGln	Scholl *et al.*[87]

Continua

Conclusão

Gene	Variantes patogênicas	Referência
CACNA1D	p.Val259Asp p.Gly403Arg p.Phe747Leu p.Ile750Met p.Arg990His	Azizan *et al.*[48]
	p.Gly403Arg p.Ile750Met p.Phe767Val p.Val1373Met	Scholl *et al.*[49]
	p.Ser652Leu p.Leu655Pro p.Tyr741Cys p.Val949Asp p.Lys981Asn p.Ala998Ile p.Ala998Val p.Val1151Phe p.Ile1152Asn p.Val1338Met	Fernandes-Rosa *et al.*[46]
	p.Val401Leu	Åkerström *et al.*[89]
	p.Phe747Val	Nanba *et al.*[70]
CACNA1H	p.Val1951Glu	Daniil *et al.*[45]
CTNNB1	p.Ser33Cys p.Ser45Phe p.Gly34Arg	Teo *et al.*[51]
	p.Ser45Pro p.Thr41Ala	Åkerström *et al*[852]

Anexo D - Parecer Consubstanciado do CEP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de mutações somáticas em adenomas corticais de suprarrenal produtores de aldosterona

Pesquisador: Madson Almeida

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 46928015.1.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.172.979

Data da Relatoria: 05/08/2015

Apresentação do Projeto:

adequada

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar se a prevalência das mutações somáticas nos genes KCNJ5, ATP1A1, ATP2B3 e CACNA1D em aldosteronomas é diferente em Brasileiros,

além de investigar novos defeitos genéticos associados com a patogênese molecular dos aldosteronomas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Mínimos. A coleta de pequenos fragmentos do tumor será realizada após a retirada do tumor durante a cirurgia e não trará desconforto ou riscos.Não há benefícios diretos ou imediatos para participação na pesquisa. Esta pesquisa poderá identificar alterações de genes que possam ser responsáveis pela doença em questão. Este fato poderá ajudar no acompanhamento e no tratamento futuro da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

não há.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq adm@hc.fm.usp.br

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Aprovado.

Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Apreciação da CONEP: Não.

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c)apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante o CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 05 de Agosto de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Prfª. Dra. Ana Claudia Latronico
Coordenadora do Programa de Pós - Graduação em Endocrinologia HCFMUSP

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Anexo E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M □ F □
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO:.....CIDADE.....CEP:.....
TELEFONE: DDD (..... .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M □ F □
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO:..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE:.....CEP:.....
TELEFONE: DDD (.....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **Investigação de mutações somáticas em adenomas corticais de suprarrenal produtores de aldosterona**
PESQUISADOR: **Dr. Madson Queiroz de Almeida**
CARGO/FUNÇÃO: **Médico** - INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **102257**
UNIDADE DO HCFMUSP: **Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento - Laboratório de Hormônios LIM-42**
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO □
RISCO BAIXO □ RISCO MAIOR □

4.DURAÇÃO DA PESQUISA: **48 meses**

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 - Justificativa e os objetivos da pesquisa: O Sr. (a é portador de um tumor na glândula suprarrenal (uma pequena glândula produtora de hormônios localizada acima do rim. O Sr. (a está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é pesquisar genes (que são estruturas presentes em todas as células do corpo e que dão as características às pessoas que estão envolvidos no desenvolvimento dos tumores da glândula suprarrenal.

Gostaríamos de consultar se o Sr. (a concordaria em participar do estudo através da doação de amostras do tumor, que serão obtidas durante ato cirúrgico A participação neste estudo é voluntária (não obrigatória e o seu tratamento será realizado mesmo que o Sr. (a decida não participar da pesquisa.

2 - Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: Para que seja feita a avaliação do gene, será necessário a coleta do material (tecido tumoral obtido durante o ato cirúrgico para ressecção tumoral (retirada do tumor e também a coleta de 5 ml de sangue (correspondente a 1 colher de sopa, através de uma picada com agulha estéril, descartável. Os desconfortos relacionados a coleta de sangue são principalmente dor e possível formação de hematoma. Será isolado DNA (material genético do sangue e do fragmento tumoral para realizar o mapeamento de alterações em genes que possam estar relacionadas com a formação dos tumores da glândula suprarrenal. As amostras de DNA e os fragmentos tumorais serão devidamente armazenados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

3 - Desconfortos e riscos esperados: Conforme explicado acima, a coleta de pequenos fragmentos do tumor será realizada após a retirada do tumor durante a cirurgia e não trará desconforto ou riscos ao Sr. (a ou seu filho (a.

4 - Benefícios que poderão ser obtidos: Não há benefícios diretos ou imediatos para participação na pesquisa. Esta pesquisa poderá identificar alterações de genes que possam ser responsáveis pela doença em questão. Este fato poderá ajudar no acompanhamento e no tratamento futuro da doença.

5 - Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: A descoberta de defeitos de genes envolvidos no desenvolvimento de tumores da glândula suprarrenal poderá permitir o diagnóstico precoce de outros casos que possam existir na família.

6 - Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o **Dr. Madson Queiroz de Almeida**, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 2 andar, Bloco 6, São Paulo, SP, 05403-900, Telefone(s (0xx11-2661-7512. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 - É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 - Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 - Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 - Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - O material coletado neste projeto será armazenado no laboratório e não será descartado após o fim desta pesquisa. O tempo de armazenamento do material será autorizado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq. Futuras pesquisas serão realizadas com o objetivo de compreender melhor a formação dos tumors adrenais e tentar descobrir novas formas de tratamento:
Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?
(..... SIM. Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.
(.... NÃO. Eu dispenso a autorização para cada pesquisa e estou informado(a que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "**Investigação de mutações somáticas em adenomas corticais de suprarrenal produtores de aldosterona**"
Eu discuti com o **Dr. Madson Queiroz de Almeida** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto
Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data: 02/02/2015

Anexo F - Protocolo de extração de DNA genômico de leucócitos de sangue periférico do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Faculdade de Medicina da USP, São Paulo

Quinze mL de sangue venoso são colhidos de veia periférica e colocados em ácido etileno diaminotetracético (EDTA 25 mM) e submetidos ao método de extração com NaCl saturado. Esta técnica possui duas etapas: na primeira é feita a lise de hemácias (NH4Cl 114 mM; NH4HCO3 1 mM) e na segunda etapa a lise de leucócitos (NaCl 150 mM; Tris- HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) utilizando solução de dodecilsulfato de sódio (SDS 0,2%) e proteinase K (160 mg/mL). A precipitação do DNA é feita com etanol absoluto gelado seguida de lavagem com etanol 70%, finalizando com sua suspensão em tampão TE (10:0,1) (10 mM TrisHCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0).

A concentração do DNA extraído é obtida por leitura em espectrofotômetro (Biophotometer, Eppendorf, Alemanha) no comprimento de onda de 260 nm (1 unidade DO 260= 50 µg/mL). A relação ideal entre as leituras em 260 e 280 nm para a caracterização da pureza do material é superior a 1,75.

As amostras de DNA são submetidas à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 1% em tampão TAE (Tris 0,004 M; Ácido Acético Glacial; EDTA 0,001M pH 8,0) contendo o corante SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) na concentração de 1x e observadas em um transiluminador com luz ultravioleta a fim de verificar sua integridade. Como padrões de massa são utilizados 500 ng do marcador de peso molecular λ HindIII (250 ng/µL) e 20 ng do λ DNA (10 ng/µL).

Anexo G - Critérios de classificação de patogenicidade das ferramentas *in sílico* utilizadas na VCF

Ferramenta	Classificação	Critérios patogênicos	Endereço eletrônico
Modelo de predição de patogenicidade			
SIFT	T: tolerado D: deletério	D	https://sift.jcvi.org/www/SIFT_chr_coords_submit.html
CADD	Numérico	≥15	http://cadd.gs.washington.edu/
Mutation Acessor	L: efeito leve M: moderado H: alto	M e H	http://mutationassessor.org/
Mutation Taster	N e P: não deletério/polimorfismo A e D: deletério	A e D	http://www.mutationtaster.org/
PROVEAN	N: neutro; D: deletério	D	http://provean.jcvi.org/genome_submit_2.php
Polyphen2	B: benigno P: possivelmente patogênico D: deletério	P e D	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
FATHMM	T: tolerado D: deletério	D	http://fathmm.biocompute.org.uk/
MetaSVM	T: tolerado D: deletério	D	https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP
MetaLR	T: tolerado D: deletério	D	https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP
Modelo para grau de conservação do aminoácido envolvido			
GERP	Numérico	≥ 2	http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/gerp/

8 REFERÊNCIAS

1. Hannemann A, Wallaschofski H. Prevalence of primary aldosteronism in patient's cohorts and in population-based studies--a review of the current literature. *Horm Metab Res.* 2012;44(3):157-62.

2. Plouin PF, Amar L, Chatellier G. Trends in the prevalence of primary aldosteronism, aldosterone-producing adenomas, and surgically correctable aldosterone-dependent hypertension. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(4):774-7.

3. Douma S, Petidis K, Doumas M, Papaefthimiou P, Triantafyllou A, Kartali N, Papadopoulos N, Vogiatzis K, Zamboulis C. Prevalence of primary hyperaldosteronism in resistant hypertension: a retrospective observational study. *Lancet*. 2008;371(9628):1921-6.

4. Calhoun DA, Nishizaka MK, Zaman MA, Thakkar RB, Weissmann P. Hyperaldosteronism among black and white subjects with resistant hypertension. *Hypertension*. 2002;40(6):892-6.

5. Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD, White A, Cushman WC, White W, Sica D, Ferdinand K, Giles TD, Falkner B, Carey RM; American Heart Association Professional Education Committee. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Circulation*. 2008;117(25):e510-26.

6. Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, Shibata H, Stowasser M, Young WF Jr. The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(5):1889-916.

7. Milliez P, Girerd X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(8):1243-8.

8. Stowasser M, Sharman J, Leano R, Gordon RD, Ward G, Cowley D, Marwick TH. Evidence for abnormal left ventricular structure and function in normotensive individuals with familial hyperaldosteronism type I. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(9):5070-6.

9. Monticone S, D'Ascenzo F, Moretti C, Williams TA, Veglio F, Gaita F, Mulatero P. Cardiovascular events and target organ damage in primary aldosteronism compared with essential hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;6(1):41-50.

10. Rossi GP, Bernini G, Caliumi C, Desideri G, Fabris B, Ferri C, Ganzaroli C, Giacchetti G, Letizia C, Maccario M, Mallamaci F, Mannelli M, Mattarello MJ, Moretti A, Palumbo G, Parenti G, Porteri E, Semplicini A, Rizzoni D, Rossi E, Boscaro M, Pessina AC, Mantero F; PAPY Study Investigators. A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(11):2293-300.

11. Monticone S, Burrello J, Tizzani D, Bertello C, Viola A, Buffolo F, Gabetti L, Mengozzi G, Williams TA, Rabbia F, Veglio F, Mulatero P. Prevalence and Clinical manifestations of primary aldosteronism encountered in primary care practice. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(14):1811-20.

12. Dekkers T, ter Meer M, Lenders JW, Hermus AR, Schultze Kool L, Langenhuijsen JF, Nishimoto K, Ogishima T, Mukai K, Azizan EA, Tops B, Deinum J, Küsters B. Adrenal nodularity and somatic mutations in primary aldosteronism: one node is the culprit? *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(7):E1341-51.

13. Nanba K, Tsuiki M, Sawai K, Mukai K, Nishimoto K, Usui T, Tagami T, Okuno H, Yamamoto T, Shimatsu A, Katabami T, Okumura A, Kawa G, Tanabe A, Naruse M. Histopathological diagnosis of primary aldosteronism using CYP11B2 immunohistochemistry. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(4):1567-74.

14. Shigematsu K, Kawai K, Irie J, Sakai H, Nakashima O, Iguchi A, Shimamatsu J, Shimamatsu K, Kusaba Y, Takahara O. Analysis of unilateral adrenal hyperplasia with primary aldosteronism from the aspect of messenger ribonucleic acid expression for steroidogenic enzymes: a comparative study with adrenal cortices adhering to aldosterone-producing adenoma. *Endocrinology*. 2006;147(2):999-1006.

15. Williams TA, Reincke M. Management of endocrine disease: diagnosis and management of primary aldosteronism: the Endocrine Society Guideline 2016 revisited. *Eur J Endocrinol*. 2018;179(1):R19-R29.

16. Rossi GP, Ceolotto G, Rossitto G, Seccia TM, Maiolino G, Berton C, Basso D, Plebani M. Prospective validation of an automated chemiluminescence-based assay of renin and aldosterone for the work-up of arterial hypertension. *Clin Chem Lab Med*. 2016;54(9):1441-50.

17. Vilela LAP, Almeida MQ. Diagnosis and management of primary aldosteronism. *Arch Endocrinol Metab*. 2017;61(3):305-12.

18. Kloos RT, Gross MD, Francis IR, Korobkin M, Shapiro B. Incidentally discovered adrenal masses. *Endocr Rev*. 1995;16(4):460-84.

19. Rossi GP, Bolognesi M, Rizzoni D, Seccia TM, Piva A, Porteri E, Tiberio GA, Giulini SM, Agabiti-Rosei E, Pessina AC. Vascular remodeling and duration of hypertension predict outcome of adrenalectomy in primary aldosteronism patients. *Hypertension*. 2008;51(5):1366-71.

20. Catena C, Colussi G, Lapenna R, Nadalini E, Chiuch A, Gianfagna P, Sechi LA. Long-term cardiac effects of adrenalectomy or mineralocorticoid antagonists in patients with primary aldosteronism. *Hypertension*. 2007;50(5):911-8.

21. Celen O, O'Brien MJ, Melby JC, Beazley RM. Factors influencing outcome of surgery for primary aldosteronism. *Arch Surg*. 1996;131(6):646-50.

22. Sawka AM, Young WF, Thompson GB, Grant CS, Farley DR, Leibson C, van Heerden JA. Primary aldosteronism: factors associated with normalization of blood pressure after surgery. *Ann Intern Med*. 2001;135(4):258-61.

23. Wambach G, Helber A, Bonner G, Hummerich W, Meurer KA, Kaufmann W. Spironolactone in essential hypertension associated with abnormal aldosterone regulation and in Conn's syndrome (author's transl). *Dtsch Med Wochenschr*. 1980;105(18):647-51.

24. Jeunemaitre X, Chatellier G, Kreft-Jais C, Charru A, DeVries C, Plouin PF, Corvol P, Menard J. Efficacy and tolerance of spironolactone in essential hypertension. *Am J Cardiol*. 1987;60(10):820-5.

25. Burgess ED, Lacourciere Y, Ruilope-Urioste LM, Oparil S, Kleiman JH, Krause S, Roniker B, Maurath C. Long-term safety and efficacy of the selective aldosterone blocker eplerenone in patients with essential hypertension. *Clin Ther*. 2003;25(9):2388-404.

26. Hundemer GL, Curhan GC, Yozamp N, Wang M, Vaidya A. Cardiometabolic outcomes and mortality in medically treated primary aldosteronism: a retrospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6(1):51-9.

27. Zennaro MC, Rickard AJ, Boulkroun S. Genetics of mineralocorticoid excess: an update for clinicians. *Eur J Endocrinol*. 2013;169(1):R15-25.

28. Zennaro MC, Boulkroun S, Fernandes-Rosa F. An update on novel mechanisms of primary aldosteronism. *J Endocrinol*. 2015;224(2):R63-77.

29. Choi M, Scholl UI, Yue P, Bjorklund P, Zhao B, Nelson-Williams C, Ji W, Cho Y, Patel A, Men CJ, Lolis E, Wisgerhof MV, Geller DS, Mane S, Hellman P, Westin G, Åkerström G, Wang W, Carling T, Lifton RP. K+ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science*. 2011;331(6018):768-72.

30. Pallauf A, Schirpenbach C, Zwermann O, Fischer E, Morak M, Holinski-Feder E, Hofbauer L, Beuschlein F, Reincke M. The prevalence of familial hyperaldosteronism in apparently sporadic primary aldosteronism in Germany: a single center experience. *Horm Metab Res*. 2012;44(3):215-20.

31. Scholl UI, Stölting G, Schewe J, Thiel A, Tan H, Nelson-Williams C, Vichot AA, Jin SC, Loring E, Untiet V, Yoo T, Choi J, Xu S, Wu A, Kirchner M, Mertins P, Rump LC, Onder AM, Gamble C, McKenney D, Lash RW, Jones DP, Chune G, Gagliardi P, Choi M, Gordon R, Stowasser M, Fahlke C, Lifton RP. CLCN2 chloride channel mutations in familial hyperaldosteronism type II. *Nat Genet*. 2018;50(3):349-54.

32. Sutherland DJ, Ruse JL, Laidlaw JC. Hypertension, increased aldosterone secretion and low plasma renin activity relieved by dexamethasone. *Can Med Assoc J*. 1966;95(22):1109-19.

33. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S, Lalouel JM. A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature*. 1992;355(6357):262-5.

34. Mulatero P, Monticone S, Rainey WE, Veglio F, Williams TA. Role of KCNJ5 in familial and sporadic primary aldosteronism. Nat Rev Endocrinol. 2013;9(2):104-12.

35. Dluhy RG, Anderson B, Harlin B, Ingelfinger J, Lifton R. Glucocorticoid-remediable aldosteronism is associated with severe hypertension in early childhood. *J Pediatr*. 2001;138(5):715-20.

36. Dluhy RG, Lifton RP. Glucocorticoid-remediable aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(12):4341-4.

37. Lafferty AR, Torpy DJ, Stowasser M, Taymans SE, Lin JP, Huggard P, Gordon RD, Stratakis CA.. A novel genetic locus for low renin hypertension: familial hyperaldosteronism type II maps to chromosome 7 (7p22). *J Med Genet*. 2000;37(11):831-5.

38. Fernandes-Rosa FL, Daniil G, Orozco IJ, Göppner C, El Zein R, Jain V, Boulkroun S, Jeunemaitre X, Amar L, Lefebvre H, Schwarzmayr T, Strom TM, Jentsch TJ, Zennaro MC. A gain-of-function mutation in the CLCN2 chloride channel gene causes primary aldosteronism. *Nat Genet.* 2018;50(3):355-61.

39. Geller DS, Zhang J, Wisgerhof MV, Shackleton C, Kashgarian M, Lifton RP. A novel form of human mendelian hypertension featuring nonglucocorticoid-remediable aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(8):3117-23.

40. Scholl UI, Nelson-Williams C, Yue P, Grekin R, Wyatt RJ, Dillon MJ, Couch R, Hammer LK, Harley FL, Farhi A, Wang WH, Lifton RP. Hypertension with or without adrenal hyperplasia due to different inherited mutations in the potassium channel KCNJ5. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(7):2533-8.

41. Charmandari E, Sertedaki A, Kino T, Merakou C, Hoffman DA, Hatch MM, Hurt DE, Lin L, Xekouki P, Stratakis CA, Chrousos GP. A novel point mutation in the KCNJ5 gene causing primary hyperaldosteronism and early-onset autosomal dominant hypertension. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(8):E1532-9.

42. Monticone S, Hattangady NG, Penton D, Isales CM, Edwards MA, Williams TA, Sterner C, Warth R, Mulatero P, Rainey WE. a Novel Y152C KCNJ5 mutation responsible for familial hyperaldosteronism type III. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(11):E1861-5.

43. Scholl UI, Stolting G, Nelson-Williams C, Vichot AA, Choi M, Loring E, Prasad ML, Goh G, Carling T, Juhlin CC, Quack I, Rump LC, Thiel A, Lande M, Frazier BG, Rasoulpour M, Bowlin DL, Sethna CB, Trachtman H, Fahlke C, Lifton RP. Recurrent gain of function mutation in calcium channel CACNA1H causes early-onset hypertension with primary aldosteronism. *Elife*. 2015;4:e06315.

44. Reimer EN, Walenda G, Seidel E, Scholl UI. CACNA1H(M1549V Mutant Calcium Channel Causes Autonomous Aldosterone Production in HAC15 Cells and Is Inhibited by Mibefradil. *Endocrinology*. 2016;157(8):3016-22.

45. Daniil G, Fernandes-Rosa FL, Chemin J, Blesneac I, Beltrand J, Polak M, Jeunemaitre X, Boulkroun S, Amar L, Strom TM, Lory P, Zennaro MC.. CACNA1H Mutations Are Associated With Different Forms of Primary Aldosteronism. *EBioMedicine*. 2016;13:225-36.

46. Fernandes-Rosa FL, Williams TA, Riester A, Steichen O, Beuschlein F, Boulkroun S, Strom TM, Monticone S, Amar L, Meatchi T, Mantero F, Cicala MV, Quinkler M, Fallo F, Allolio B, Bernini G, Maccario M, Giacchetti G, Jeunemaitre X, Mulatero P, Reincke M, Zennaro MC. Genetic spectrum and clinical correlates of somatic mutations in aldosterone-producing adenoma. *Hypertension*. 2014;64(2):354-61.

47. Beuschlein F, Boulkroun S, Osswald A, Wieland T, Nielsen HN, Lichtenauer UD, Penton D, Schack VR, Amar L, Fischer E, Walther A, Tauber P, Schwarzmayr T, Diener S, Graf E, Allolio B, Samson-Couterie B, Benecke A, Quinkler M, Fallo F, Plouin PF, Mantero F, Meitinger T, Mulatero P, Jeunemaitre X, Warth R, Vilsen B, Zennaro MC, Strom TM, Reincke M. Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension. *Nat Genet.* 2013;45(4):440-4, 4e1-2.

48. Azizan EA, Poulsen H, Tuluc P, Zhou J, Clausen MV, Lieb A, Maniero C, Garg S, Bochukova EG, Zhao W, Shaikh LH, Brighton CA, Teo AE, Davenport AP, Dekkers T, Tops B, Küsters B, Ceral J, Yeo GS, Neogi SG, McFarlane I, Rosenfeld N, Marass F, Hadfield J, Margas W, Chaggar K, Solar M, Deinum J, Dolphin AC, Farooqi IS, Striessnig J, Nissen P, Brown MJ.. Somatic mutations in ATP1A1 and CACNA1D underlie a common subtype of adrenal hypertension. *Nat Genet.* 2013;45(9):1055-60.

49. Scholl UI, Goh G, Stolting G, de Oliveira RC, Choi M, Overton JD, Fonseca AL, Korah R, Starker LF, Kunstman JW, Prasad ML, Hartung EA, Mauras N, Benson MR, Brady T, Shapiro JR, Loring E, Nelson-Williams C, Libutti SK, Mane S, Hellman P, Westin G, Åkerström G, Björklund P, Carling T, Fahlke C, Hidalgo P, Lifton RP. Somatic and germline CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism. *Nat Genet*. 2013;45(9):1050-4.

50. Berthon A, Martinez A, Bertherat J, Val P. Wnt/β-catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;351(1):87-95.

51. Teo AE, Brown MJ. Pregnancy, Primary Aldosteronism, and Somatic CTNNB1 Mutations. *N Engl J Med*. 2016;374(15):1494.

52. Åkerström T, Maharjan R, Sven Willenberg H, Cupisti K, Ip J, Moser A, Stålberg P, Robinson B, Alexander Iwen K, Dralle H, Walz MK, Lehnert H, Sidhu S, Gomez-Sanchez C, Hellman P, Björklund P. Activating mutations in CTNNB1 in aldosterone producing adenomas. *Sci Rep*. 2016;6:19546.

53. Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. A*nnu Rev Cell Dev Biol*. 1998;14:59-88.

54. Berthon A, Drelon C, Ragazzon B, Boulkroun S, Tissier F, Amar L, Samson-Couterie B, Zennaro MC, Plouin PF, Skah S, Plateroti M, Lefèbvre H, Sahut-Barnola I, Batisse-Lignier M, Assié G, Lefrançois-Martinez AM, Bertherat J, Martinez A, Val P. WNT/β-catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. *Hum Mol Genet*. 2014;23(4):889-905.

55. Williams TA, Lenders JWM, Mulatero P, Burrello J, Rottenkolber M, Adolf C, Satoh F, Amar L, Quinkler M, Deinum J, Beuschlein F, Kitamoto KK, Pham U, Morimoto R, Umakoshi H, Prejbisz A, Kocjan T, Naruse M, Stowasser M1, Nishikawa T, Young WF Jr, Gomez-Sanchez CE, Funder JW, Reincke M; Primary Aldosteronism Surgery Outcome (PASO) investigators. Outcomes after adrenalectomy for unilateral primary aldosteronism: an international consensus on outcome measures and analysis of remission rates in an international cohort. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5(9):689-99.

56. Malachias MVB, Gomes MAM, Nobre F, Alessi A, Feitosa AD, Coelho EB. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Chapter 2 - Diagnosis and Classification. *Arq Bras Cardiol*. 2016;107(3 Suppl 3):7-13.

57. Williams B, Mancia G, Spiering W, Rosei EA, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, de Simone G, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon J, Ruilope L, Zanchetti A, Kerins M, Kjeldsen SE, Kreutz R, Laurent S, Lip GYH, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F, Schmieder RE, Shlyakhto E, Tsioufis C, Aboyans V, Desormais I. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC and the European Society of Hypertension (ESH). *G Ital Cardiol (Rome)*. 2018;19(11):3-73.

58. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.

59. Xie Y, Huang D, Wei L, Luo XJ. Further evidence for the genetic association between CACNA1I and schizophrenia. *Hereditas*. 2018;155:16.

60. Zennaro MC, Boulkroun S, Fernandes-Rosa F. Genetic Causes of Functional Adrenocortical Adenomas. *Endocr Rev*. 2017;38(6):516-37.

61. Zennaro MC, Fernandes-Rosa FL, Boulkroun S. Overview of aldosterone-related genetic syndromes and recent advances. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2018;25(3):147-54.

62. Boulkroun S, Beuschlein F, Rossi GP, Golib-Dzib JF, Fischer E, Amar L, Mulatero P, Samson-Couterie B, Hahner S, Quinkler M, Fallo F, Letizia C, Allolio B, Ceolotto G, Cicala MV, Lang K, Lefebvre H, Lenzini L, Maniero C, Monticone S, Perrocheau M, Pilon C, Plouin PF, Rayes N, Seccia TM, Veglio F, Williams TA, Zinnamosca L, Mantero F, Benecke A, Jeunemaitre X, Reincke M, Zennaro MC. Prevalence, clinical, and molecular correlates of KCNJ5 mutations in primary aldosteronism. *Hypertension*. 2012;59(3):592-8.

63. Zheng FF, Zhu LM, Nie AF, Li XY, Lin JR, Zhang K, Chen J, Zhou WL, Shen ZJ, Zhu YC, Wang JG, Zhu DL, Gao PJ. Clinical characteristics of somatic mutations in Chinese patients with aldosterone-producing adenoma. *Hypertension*. 2015;65(3):622-8.

64. Okamura T, Nakajima Y, Katano-Toki A, Horiguchi K, Matsumoto S, Yoshino S, Yamada E, Tomaru T, Ishii S, Saito T, Ozawa A, Shibusawa N, Satoh T, Okada S, Nagaoka R, Takada D, Horiguchi J, Oyama T, Yamada M. Characteristics of Japanese aldosterone-producing adenomas with KCNJ5 mutations. *Endocr J*. 2017;64(1):39-47.

65. Åkerström T, Crona J, Delgado Verdugo A, Starker LF, Cupisti K, Willenberg HS, Knoefel WT, Saeger W, Feller A, Ip J, Soon P, Anlauf M, Alesina PF, Schmid KW, Decaussin M, Levillain P, Wängberg B, Peix JL, Robinson B, Zedenius J, Bäckdahl M, Caramuta S, Iwen KA, Botling J, Stålberg P, Kraimps JL, Dralle H, Hellman P, Sidhu S, Westin G, Lehnert H, Walz MK, Åkerström G, Carling T, Choi M, Lifton RP, Björklund P. Comprehensive re-sequencing of adrenal aldosterone producing lesions reveal three somatic mutations near the KCNJ5 potassium channel selectivity filter. *PLoS One*. 2012;7(7):e41926.

66. Lenzini L, Rossitto G, Maiolino G, Letizia C, Funder JW, Rossi GP. A Meta-Analysis of Somatic KCNJ5 K(+ Channel Mutations In 1636 Patients With an Aldosterone-Producing Adenoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(8):E1089-95.

67. Weiss N, Zamponi GW. T-type calcium channels: From molecule to therapeutic opportunities. *Int J Biochem Cell Biol*. 2019;108:34-9.

68. Nanba K, Omata K, Else T, Beck PCC, Nanba AT, Turcu AF, Miller BS, Giordano TJ, Tomlins SA, Rainey WE. Targeted Molecular Characterization of Aldosterone-Producing Adenomas in White Americans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(10):3869-76.

69. Fernandes-Rosa FL, Giscos-Douriez I, Amar L, Gomez-Sanchez CE, Meatchi T, Boulkroun S, Zennaro MC. Different Somatic Mutations in Multinodular Adrenals With Aldosterone-Producing Adenoma. *Hypertension*. 2015;66(5):1014-22.

70. Nanba K, Chen AX, Omata K, Vinco M, Giordano TJ, Else T, Hammer GD, Tomlins SA, Rainey WE. Molecular Heterogeneity in Aldosterone-Producing Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(3):999-1007.

71. Nishimoto K, Nakagawa K, Li D, Kosaka T, Oya M, Mikami S, Shibata H, Itoh H, Mitani F, Yamazaki T, Ogishima T, Suematsu M, Mukai K. Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(5):2296-305.

72. Nishimoto K, Tomlins SA, Kuick R, Cani AK, Giordano TJ, Hovelson DH, Liu CJ, Sanjanwala AR, Edwards MA, Gomez-Sanchez CE, Nanba K, Rainey WE. Aldosterone-stimulating somatic gene mutations are common in normal adrenal glands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(33):E4591-9.

73. Omata K, Anand SK, Hovelson DH, Liu CJ, Yamazaki Y, Nakamura Y, Ito S, Satoh F, Sasano H, Rainey WE, Tomlins SA. Aldosterone-Producing Cell Clusters Frequently Harbor Somatic Mutations and Accumulate With Age in Normal Adrenals. *J Endocr So*c. 2017;1(7):787-99.

74. Williams TA, Lenders JWM, Mulatero P, Burrello J, Rottenkolber M, Adolf C, Satoh F, Amar L, Quinkler M, Deinum J, Beuschlein F, Kitamoto KK, Pham U, Morimoto R, Umakoshi H, Prejbisz A, Kocjan T, Naruse M, Stowasser M, Nishikawa T, Young WF Jr, Gomez-Sanchez CE, Funder JW, Reincke M; Primary Aldosteronism Surgery Outcome (PASO) investigators. Outcomes after adrenalectomy for unilateral primary aldosteronism: an international consensus on outcome measures and analysis of remission rates in an international cohort. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017 ;5(9):689-99.

75. Meyer A, Brabant G, Behrend M. Long-term follow-up after adrenalectomy for primary aldosteronism. *World J Surg*. 2005;29(2):155-9.

76. Streeten DH, Anderson GH, Wagner S. Effect of age on response of secondary hypertension to specific treatment. *Am J Hypertens*. 1990;3(5 Pt 1):360-5.

77. Arnesen T, Glomnes N, Stromsoy S, Knappskog S, Heie A, Akslen LA, Grytaas M, Varhaug JE, Gimm O, Brauckhoff M. Outcome after surgery for primary hyperaldosteronism may depend on KCNJ5 tumor mutation status: a population-based study from Western Norway. *Langenbecks Arch Surg*. 2013;398(6):869-74.

78. Ip JC, Pang TC, Pon CK, Zhao JT, Sywak MS, Gill AJ, Soon PS, Sidhu SB. Mutations in KCNJ5 determines presentation and likelihood of cure in primary hyperaldosteronism. *ANZ J Surg*. 2015;85(4):279-83.

79. Wu VC, Wang SM, Chueh SJ, Yang SY, Huang KH, Lin YH, Wang JJ, Connolly R, Hu YH, Gomez-Sanchez CE, Peng KY, Wu KD. The prevalence of CTNNB1 mutations in primary aldosteronism and consequences for clinical outcomes. *Sci Rep*. 2017;7:39121.

80. Kitamoto T, Omura M, Suematsu S, Saito J, Nishikawa T. KCNJ5 mutation as a predictor for resolution of hypertension after surgical treatment of aldosterone-producing adenoma. *J Hypertens*. 2018;36(3):619-27.

81. Nanba K, Omata K, Gomez-Sanchez CE, Stratakis CA, Demidowich AP, Suzuki M, Thompson LDR, Cohen DL, Luther JM, Gellert L, Vaidya A Barletta JA1, Else T, Giordano TJ, Tomlins SA, Rainey WE. Genetic Characteristics of Aldosterone-Producing Adenomas in Blacks. *Hypertension*. 2019;73(4):885-892.

82. Lerario AM, Nanba K, Blinder AR, Suematsu S, Omura M, Nishikawa T, Giordano TJ, Rainey W, Else T.. Genetics of aldosterone-producing adenomas with pathogenic KCNJ5 variants. *Endocr Relat Cancer*. 2019 Feb 1. pii: ERC-18-0364.R2. doi: 10.1530/ERC-18-0364. [Epub ahead of print].

83. Mulatero P, Tauber P, Zennaro MC, Monticone S, Lang K, Beuschlein F, Fischer E, Tizzani D, Pallauf A, Viola A, Amar L, Williams TA, Strom TM, Graf E, Bandulik S, Penton D, Plouin PF, Warth R, Allolio B, Jeunemaitre X, Veglio F, Reincke M. KCNJ5 mutations in European families with nonglucocorticoid remediable familial hyperaldosteronism. *Hypertension*. 2012;59(2):235-40.

84. Murthy M, Azizan EA, Brown MJ, O'Shaughnessy KM. Characterization of a novel somatic KCNJ5 mutation delI157 in an aldosterone-producing adenoma. *J Hypertens*. 2012;30(9):1827-33.

85. Williams TA, Monticone S, Schack VR, Stindl J, Burrello J, Buffolo F, Annaratone L, Castellano I, Beuschlein F, Reincke M, Lucatello B, Ronconi V, Fallo F, Bernini G, Maccario M, Giacchetti G, Veglio F, Warth R, Vilsen B, Mulatero P. Somatic ATP1A1, ATP2B3, and KCNJ5 mutations in aldosterone-producing adenomas. *Hypertension*. 2014;63(1):188-95.

86. Cheng CJ, Sung CC, Wu ST, Lin YC, Sytwu HK, Huang CL, Lin SH. Novel KCNJ5 mutations in sporadic aldosterone-producing adenoma reduce Kir3.4 membrane abundance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(1):E155-63.

87. Scholl UI, Healy JM, Thiel A, Fonseca AL, Brown TC, Kunstman JW, Horne MJ, Dietrich D, Riemer J, Kücükköylü S, Reimer EN, Reis AC, Goh G, Kristiansen G, Mahajan A, Korah R, Lifton RP, Prasad ML, Carling T. Novel somatic mutations in primary hyperaldosteronism are related to the clinical, radiological and pathological phenotype. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015;83(6):779-89.

88. Hardege I, Xu S, Gordon RD, Thompson AJ, Figg N, Stowasser M, Murrell-Lagnado R, O'Shaughnessy KM. Novel Insertion Mutation in KCNJ5 Channel Produces Constitutive Aldosterone Release From H295R Cells. *Mol Endocrinol*. 2015;29(10):1522-30.

89. Åkerström T, Willenberg HS, Cupisti K, Ip J, Backman S, Moser A, Maharjan, Robinson, Iwen K, Dralle, D Volpe, Bäckdahl, Botling, Stålberg, Westin, Walz M Lehnert, Sidhu, Zedenius, Björklund P, Hellman P. Novel somatic mutations and distinct molecular signature in aldosterone-producing adenomas. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22(5):735-44.

90. Dutta RK, Welander J, Brauckhoff M, Walz M, Alesina P, Arnesen T, Söderkvist P, Gimm O. Complementary somatic mutations of KCNJ5, ATP1A1, and ATP2B3 in sporadic aldosterone producing adrenal adenomas. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(1):L1-4.