GUILHERME ASMAR ALENCAR

**Aspectos clínicos e moleculares da hiperplasia adrenal
macronodular independente de ACTH
em sua forma familiar**

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Alencar, Guilherme Asmar

Aspectos clínicos e moleculares da hiperplasia adrenal macronodular independente de ACTH em sua forma familiar / Guilherme Asmar Alencar. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Maria Candida Barisson Villares Fragoso.

Descritores: 1.Hiperplasia adrenal macronodular independente de ACTH familiar 2.Síndrome de Cushing/diagnóstico 3.Síndrome de Cushing/etiologia 4.Síndrome de Cushing/genética 5.Sinais e sintomas 6.Tomografia 7.Tomografia por emissão de pósitrons e tomografia computadorizada 8.Meningioma 9.Receptores de superfície celular 10.Técnicas de genotipagem 11.Ligação genética 12.Polimorfismo de nucleotídeo único

USP/FM/DBD-271/13

Este trabalho foi realizado na Unidade de Suprarrenal e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM/42) da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, Brasil e no *Centre Hospitalier de l'Université de Montréal*, Montreal/QC, Canadá. Contou com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (bolsa de doutorado direto – demanda social e programa de doutorado sanduíche no exterior – PDSE 2590/11-5) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (auxílio à pesquisa – regular 2010/12702-1).

Dedicatória

Aos meus pais, pelo exemplo e apoio incondicional.

Aos pacientes, pela confiança depositada em mim.

A todos os meus professores, pelos ensinamentos e valores partilhados.

Agradecimientos

Primeiramente, agradeço a Deus e a todos lá de cima, por estarem sempre olhando por mim.

À minha orientadora, Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso, agradeço a atenção dedicada, o apoio e a confiança depositada em mim. Seu incentivo e otimismo incansáveis foram, sem dúvida, importantes para a condução deste trabalho.

Sou imensamente grato à nossa chefe, Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça, pela oportunidade ímpar. Onipresente em todas as etapas deste trabalho, médica experiente e pesquisadora renomada, contribuiu de forma imprescindível para o meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço ao Dr. André Lacroix, pelo suporte e pela disponibilidade durante minha permanência no *Centre Hospitalier de l'Université de Montréal* (CHUM), Montreal/QC, Canadá. Sob sua orientação, foi conduzido o estudo de ligação genética em escala genômica e pude aprimorar meu conhecimento clínico na área de Endocrinologia.

Ao amigo Antônio Marcondes Lerário, pela pronta disponibilidade em responder aos meus questionamentos e por suas sugestões valiosas e oportunas.

À Dra. Mirian Yumie Nishi e às amigas Mariana Funari e Beatriz Marinho de Paula Mariani, que me auxiliaram durante os experimentos de bancada, sempre solícitas, prestativas e pacientes.

Aos Doutores Manoel De Souza Rocha e Gilberto Carlos Gomes, do Departamento de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), pela revisão e interpretação dos exames de imagem.

À Dra. Lilian Yuri Itaya Yamaga, do Departamento de Imagem do Hospital Israelita Albert Einstein, por sua disponibilidade para a realização e interpretação dos exames de tomografia por emissão de pósitrons com fluordesoxiglicose marcada, acoplada à tomografia computadorizada (^{18}F -FDG-PET/CT).

Aos Doutores Isabelle Bourdeau, do *Centre Hospitalier de l'Université de Montréal* (CHUM), Montreal/QC, Canadá, Pavel Hamet e Johanna Sandoval, ambos do Laboratório *Prognomix*, Montreal/QC, Canadá, pelo suporte técnico e científico durante o estudo de ligação genética em escala genômica e a análise de bioinformática dos dados.

Ao amigo Marcos Madureira e ao Dr. Marcelo Canuto, médicos radiologistas do Pasteur Medicina Diagnóstica/Diagnósticos da América SA, que tornaram viável a realização de parte dos exames de imagem em Brasília/DF.

Ao amigo Guilherme Collares e ao Dr. William Pedrosa, que viabilizaram a realização de alguns exames laboratoriais no Laboratório Hermes Pardini em Belo Horizonte/MG.

Aos Doutores Ana Amélia Fialho de Oliveira Hoff, Madson Queiroz de Almeida e Vinicius Nahime de Brito, pelas sugestões relevantes e comentários sempre pertinentes, durante a qualificação.

Ao Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge, por sua disponibilidade em esclarecer meus questionamentos e pelas sugestões oportunas.

Aos Doutores Ivo Jorge Prado Arnhold e Ana Claudia Latrônico, pelas dicas e comentários relevantes.

À Dra. Sorahia Domenice, pelo aprendizado valioso durante o Estágio Supervisionado em Docência na Disciplina de Endocrinologia do HCFMUSP.

Aos amigos do Ambulatório de Suprarrenal do HCFMUSP, André, Gabriela, Lorena e Luciana Brito, pelo convívio e aprendizado mútuo no atendimento aos pacientes.

Às amigas Letícia e Éricka, por suas sugestões oportunas e pelas conversas.

A todos assistentes e colegas da pós-graduação do Laboratório LIM/42 do HCFMUSP, que contribuíram para a realização deste trabalho e propiciaram um ambiente de pesquisa agradável.

A todos os funcionários do LIM/42, em especial: Nilda e Rosangele, pelo profissionalismo ímpar e trabalho irretocável; Cidinha, por sua organização e dinamismo na compra dos materiais; Cris e Rosana, por trazerem mais humor aos meus dias e atenderem prontamente às minhas inúmeras solicitações de alíquotas; Neide, Adriana, Ângela, Gislene e Poline, pelo rigor e profissionalismo com que realizaram as infindáveis dosagens hormonais solicitadas; e Fran, por sua dedicação no cuidado com o laboratório.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), meu agradecimento pelo apoio financeiro.

Um agradecimento especial aos meus pais, Edgar e Clarisse, pelo exemplo de vida e caráter, pela confiança, paciência, e, sobretudo, pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida. À minha mãe, uma pessoa extremamente ativa, dinâmica e companheira, que sempre colocou os filhos em primeiro lugar; como orientadora educacional, ensinou-me desde cedo que o estudo, muito mais do que uma obrigação, pode e deve proporcionar satisfação e prazer. Ao meu pai, que soube trilhar uma carreira universitária de sucesso, fundamentada no estudo, trabalho árduo

e, sobretudo, na ética e respeito ao próximo; sociólogo e professor titular, é um grande exemplo de que é possível alcançar êxito na vida acadêmica, sendo uma pessoa justa e um pai presente. À minha irmã Mariana, agradeço o carinho e apoio constantes, sobretudo nos momentos mais difíceis, quando não me deixou esmorecer.

Agradeço à Tatiane o apoio e as palavras de alento e a todos os meus amigos, em particular, Blander, Ana, João e Juliano, os momentos de descontração.

A todos os meus professores, que partilharam comigo seus conhecimentos e vivências, sobretudo, aos Doutores Luiz Otavio Savassi Rocha, Teresa Cristina de Abreu Ferrari, Walter dos Reis Caixeta Braga e Antônio Ribeiro de Oliveira Junior, que tiveram um papel preponderante para que eu escolhesse a Clínica Médica e a Endocrinologia como especialidades.

Por fim, um agradecimento especial aos pacientes, pela confiança que depositaram em mim.

Epígrafe

"De repente, a vida começou a impor-se, a desafiar-me com seus pontos de interrogação, que se desmanchavam para dar lugar a outros. Eu liquidava esses outros e apareciam novos."

Carlos Drummond de Andrade

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

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

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

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

Sumário

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Síndrome de Cushing	2
1.2 Hiperplasia adrenal macronodular independente de ACTH	3
1.2.1 Características clínicas e laboratoriais	4
1.2.2 Características radiológicas	6
1.2.3 Anatomopatológico	8
1.2.4 Fisiopatologia e mecanismos moleculares da AIMAH	9
1.2.4.1 Autonomia do córtex adrenal	9
1.2.4.2 Regulação anormal do córtex adrenal por receptores hormonais aberrantes	10
1.2.4.3 Mutação do receptor do ACTH (MC2R)	17
1.2.4.4 Mutação da subunidade alfa da proteína Gs	17
1.2.4.5 Associação com a neoplasia endócrina múltipla do tipo 1 (NEM1)	19
1.2.4.6 Associação com a polipose adenomatosa familiar	20
1.2.4.7 Associação com a leiomiomatose hereditária e carcinoma de células renais	21
1.2.4.8 Vias de sinalização e alterações genéticas potencialmente relacionadas à AIMAH	22
1.2.5 Tratamento	27

2 OBJETIVOS	29
3 MÉTODOS	31
3.1 Considerações éticas	32
3.2 Casuística	32
3.3 Estudo clínico	34
3.3.1 Avaliação clínica dos pacientes	34
3.3.2 Avaliação laboratorial inicial	36
3.3.3 Avaliação radiológica inicial	38
3.3.4 Complementação da propedêutica laboratorial	40
3.3.5 Pesquisa de receptores hormonais aberrantes nas adrenais	42
3.3.6 Propedêutica de imagem para a investigação de meningiomas	48
3.3.7 Exame de ^{18}F -FDG-PET/CT	48
3.3.8 Análise estatística do estudo clínico	50
3.4 Estudo molecular	51
3.4.1 Extração de DNA genômico de leucócitos do sangue periférico	51
3.4.2 Reação em cadeia da polimerase e sequenciamento do gene <i>MC2R</i>	53
3.4.3 Estudo de ligação genética utilizando microssatélites específicos	55
3.4.4 Estudo de ligação genética em escala genômica utilizando SNPs	58
3.4.5 Análise de bioinformática	62
3.4.6 Reação em cadeia da polimerase e sequenciamento de genes suspeitos	65

4	RESULTADOS	67
4.1	Estudo clínico	68
4.1.1	Achados clínicos e laboratoriais	68
4.1.2	Achados radiológicos	78
4.1.3	Pesquisa de receptores hormonais aberrantes nas adrenais	83
4.1.4	Propedêutica de imagem para a investigação de meningiomas	84
4.1.5	Exame de ^{18}F -FDG-PET/CT	86
4.2	Estudo molecular	89
4.2.1	Sequenciamento do <i>MC2R</i> e estudo de ligação genética utilizando microssatélites	89
4.2.2	Estudo de ligação genética em escala genômica utilizando SNPs	96
5	DISCUSSÃO	105
5.1	Achados clínicos, laboratoriais e radiológicos	106
5.2	Papel dos receptores hormonais aberrantes na AIMAH familiar	112
5.3	Associação entre AIMAH e meningiomas intracranianos	113
5.4	Padrão de captação da ^{18}F -FDG no exame de PET/CT	115
5.5	Estudo molecular	117
6	CONCLUSÕES	121
6.1	Aspectos clínicos	122
6.2	Aspectos moleculares	124
7	ANEXOS	125
8	REFERÊNCIAS	135

*Lista de Abreviaturas
e Símbolos*

$>$	maior que
$<$	menor que
$=$	igual a
$\geq$	maior ou igual
$\leq$	menor ou igual
$\Uparrow$	aumentada
$\Leftrightarrow$	semelhante
$\Downarrow$	diminuída
♀	feminino
♂	masculino
α	alfa
β	beta
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
Δ	delta
$\Delta 4$	androstenediona
γ	gama
$^{18}\text{F-FDG}$	fluordesoxiglicose marcada
$^{18}\text{F-FDG-PET/CT}$	tomografia por emissão de pósitrons com fluordesoxiglicose marcada, acoplada à tomografia computadorizada
$3\beta\text{-HSD2}$	3β -hidroxiesteroide desidrogenase do tipo 2
A	adenina
AC	adenilato ciclase
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico

ACTHR	receptor do hormônio adrenocorticotrófico
Ad.	adrenal
AGCC	<i>Affymetrix GeneChip Command Console</i>
AIMAH	hiperplasia adrenal macronodular independente de ACTH
<i>AKT1</i>	<i>V-AKT murine thymoma viral oncogene homolog 1 gene</i>
AMPc	adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico
<i>APC</i>	<i>adenomatous polyposis coli gene</i>
APC	proteína adenomatous polyposis coli
APR	atividade plasmática de renina
Arg	arginina
ATP	adenosina trifosfato
<i>BAM22 (AP1B1)</i>	<i>adaptor-related protein complex 1, beta-1 subunit gene</i>
bp	par de base
C	citossina
CA	Califórnia
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAPPesq	Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa
<i>CCND1</i>	<i>cyclin D1 gene</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2a gene</i>
cDNA	DNA complementar
<i>CHEK2</i>	<i>checkpoint kinase 2, s. pombe, homolog of gene</i>
CHUM	<i>Centre Hospitalier de l'Université de Montréal</i>

Circ.	circunferência
cm	centímetro
cM	centimorgan
cm ²	centímetro quadrado
CRE	elemento responsivo ao AMPc
CREB	proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc
<i>CREBBP</i>	<i>creb-binding protein gene</i>
CRSP9	cofator requerido para a ativação transcricional de SP1, subunidade 9
CS	<i>Cushing's syndrome</i>
CT	<i>computed tomography</i>
CV	coeficiente de variação
CYP11A1	colesterol desmolase
CYP11B1	11 β -hidroxilase
CYP17A1	17 α -hidroxilase/17,20-liase
CYP21A2	21-hidroxilase
Cys	cisteína
D	direita
DAG	dialcilglicerol
<i>DAL1 (EPB41L3)</i>	<i>erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3 gene</i>
Dexa	dexametasona
DF	Distrito Federal
DHEAS	<i>dehydroepiandrosterone sulphate</i>
DICOM	<i>digital imaging and communications in medicine</i>

DM	diabete melito
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeo
Dr(a).	doutor(a)
E	epinefrina ou esquerda (conforme o contexto)
Ed.	edição
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
<i>et al.</i>	e outros
EUA	Estados Unidos da América
EV	endovenoso
ex.	exemplo
F	feminino ou cortisol (conforme o contexto)
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FC	frequência cardíaca
<i>FH</i>	<i>fumarate hydratase gene</i>
FH	proteína fumarato hidratase
FLAIR	<i>fluid-attenuated inversion recovery</i>
FSE	<i>fast spin echo</i>
FSH	hormônio folículo estimulante
g	grama
G	guanina
GDP	guanidina difosfato
Gi	proteína G inibitória
GIP	peptídeo inibitório gástrico

GLUT-1	proteína transportadora de glicose 1
Gly	glicina
<i>GNAS</i>	<i>GNAS complex locus gene</i>
GPCR	receptores transmembrana acoplados à proteína G
<i>GPR114</i>	<i>G protein-coupled receptor 114 gene</i>
<i>GPR56</i>	<i>G protein-coupled receptor 56 gene</i>
<i>GPR97</i>	<i>G protein-coupled receptor 97 gene</i>
GRE	<i>gradient echo</i>
Gs	proteína G estimulatória
Gsa	subunidade alfa da proteína G estimulatória
gsp	<i>G stimulatory protein</i>
GTP	guanidina trifosfato
h	hora
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
hCG	gonadotrofina coriônica humana
HDL	lipoproteína de alta densidade
HIF1	fator 1 induzido por hipóxia
HIFs	fatores de transcrição induzidos por hipóxia
HLRCC	leiomiomatose hereditária e carcinoma de células renais
IA	Iowa
IBD	idênticos por descendência
IC	intervalo de confiança

IMC	índice de massa corporal
Inc.	<i>incorporation</i>
Ind.	indivíduo
IP3	inositol trifosfato
kg	quilograma
kg/m ²	quilograma por metro quadrado
<i>KLF4</i>	<i>kruppel-like factor 4 gene</i>
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LH	hormônio luteinizante
LH/hCGR	receptor do hormônio luteinizante
LHRH	gonadorrelina
<i>LOD score</i>	logaritmo na base 10 de uma razão de verossimilhança
LOH	perda da heterozigosidade
Ltda.	limitada
M	masculino, mitocôndria ou molar (conforme o contexto)
Mb	megabase
MBq/kg	megabequerel por quilograma
MC2R	receptor do ACTH
<i>MC2R</i>	<i>melanocortin 2 receptor gene</i>
mcg	micrograma
mcg/24h	micrograma em 24 horas
mcg/dL	micrograma por decilitro
mCi/kg	millicurie por quilograma
mcL	microlitro

mcM	micromolar
mcU/mL	microunidade por mililitro
MD	Maryland
<i>MEN1</i>	<i>multiple endocrine neoplasia type 1 gene</i>
mg	miligrama
MG	Minas Gerais
mg/dL	miligrama por decilitro
mg/mL	miligrama por mililitro
MI	Michigan
min	minuto
miRNAs	microRNAs
mL	mililitro
<i>MLH1</i>	<i>mutL, E. coli, homolog of, 1 gene</i>
mm	milímetro
mM	milimolar
MN	Minesota
<i>MNI</i>	<i>meningioma 1 gene</i>
MO	Missouri
MRAP	proteína acessória do MC2R
<i>MRAP</i>	<i>melanocortin 2 receptor accessory protein gene</i>
MRAP2	proteína acessória 2 do MC2R
<i>MRAP2</i>	<i>melanocortin 2 receptor accessory protein 2 gene</i>
mRNA	RNA mensageiro
<i>MSH2</i>	<i>mutS, E. coli, homolog of, 2 gene</i>

<i>MSH6</i>	<i>mutS, E. coli, homolog of, 6 gene</i>
N	núcleo
NCBI	<i>National Center for Biotechnology and Information</i>
NE	norepinefrina
NEM1	neoplasia endócrina múltipla do tipo 1
<i>NF1</i>	<i>neurofibromin 1 gene</i>
<i>NF2</i>	<i>neurofibromin 2 gene</i>
ng	nanograma
ng/dL	nanograma por decilitro
ng/mL	nanograma por mililitro
ng/mL/h	nanograma por mililitro por hora
nm	nanômetro
OH	Ohio
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OSEM	maximização da expectativa do subconjunto organizado
<i>P53</i>	<i>tumor protein p53 gene</i>
PA	pressão arterial
PCR	reação em cadeia da polimerase
<i>PDE11A</i>	<i>phosphodiesterase 11A gene</i>
PDSE	Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior
PET	tomografia por emissão de pósitrons
PET/CT	tomografia por emissão de pósitrons acoplada à tomografia computadorizada
pg/dL	picograma por decilitro

pg/mL	picograma por mililitro
PHDs	prolil-hidroxilases
Phe	fenilalanina
PKA	proteína cinase A
PLC	fosfolipase C
pmol	picomol
<i>PMS2</i>	<i>postmeiotic segregation increased, S. cerevisiae, 2 gene</i>
PPNAD	doença adrenocortical nodular pigmentada primária
<i>PRKARIA</i>	<i>protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha gene</i>
Prof(a).	professor(a)
<i>PTCH1</i>	<i>patched, drosophila, homolog of, 1 gene</i>
<i>PTCH2</i>	<i>patched, drosophila, homolog of, 2 gene</i>
<i>PTEN1</i>	<i>phosphatase and tensin homolog gene</i>
QC	controle de qualidade ou Quebec (conforme o contexto)
RE	enzima de restrição
<i>RECQL2</i>	<i>recq protein-like 2 gene</i>
RM	ressonância magnética
RNA	ácido ribonucleico
RPM	rotação por minuto
SA	sensibilidade analítica ou sociedade anônima (conforme o contexto)
SAGE	<i>Statistical Analysis for Genetic Epidemiology</i>
SC	síndrome de Cushing

SDHEA	sulfato de desidroepiandrosterona
Ser	serina
<i>SMARCB1</i>	<i>SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1 gene</i>
<i>SMARCE1</i>	<i>SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1 gene</i>
<i>SMO</i>	<i>smoothened, drosophila, homolog of gene</i>
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único
SP	São Paulo
SP1	proteína da especificidade 1
SP3	proteína da especificidade 3
StAR	proteína reguladora aguda da esteroidogênese
<i>SUFU</i>	<i>suppressor of fused, drosophila, homolog of gene</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
SUV _{max}	valor padrão de captação máxima
SUV _{média}	valor padrão de captação média
T	timina
T. postural	teste postural
TC	tomografia computadorizada
TE	NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM pH 8,0
TF	fatores de transcrição
<i>TRAF7</i>	<i>ring finger and WD repeat domains-containing protein 1 gene</i>
TRH	hormônio liberador de tirotrofina

TSDexa	teste de supressão noturna com 1 mg de dexametasona via oral à meia-noite
TSH	hormônio tirotrófico
U	unidade
U/L	unidade por litro
UH	unidade Hounsfield
V1R	receptor V1 da vasopressina
<i>VHL</i>	<i>von Hippel-Lindau gene</i>
VO	via oral
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
VR	valor de referência
VU	volume urinário
WI	Wisconsin
Wnt	<i>wingless-type MMTV integration site</i>

Lista de Figuras

Figura 1.	Regulação normal do córtex adrenal mediada pelo ACTH.	11
Figura 2.	Regulação anormal do córtex adrenal mediada por receptores hormonais aberrantes (ilícitos).	13
Figura 3.	Heredograma da família com AIMAH, contendo os indivíduos inicialmente avaliados.	33
Figura 4.	Heredograma da família com AIMAH, contendo os indivíduos avaliados ao final do estudo.	33
Figura 5.	Protocolo utilizado na anamnese e no exame físico dos indivíduos pertencentes à genealogia com AIMAH familiar.	35
Figura 6.	Dimensões da glândula adrenal avaliadas no plano axial.	39
Figura 7.	Principais etapas do estudo molecular conduzido para a investigação da etiologia genética da AIMAH familiar.	51
Figura 8.	Principais etapas do processo de genotipagem dos SNPs.	60
Figura 9.	Representação do <i>GeneChip Scanner 3000 7G</i> e do cartucho contendo em seu interior o <i>GeneChip Genome-Wide Human SNP Array 6.0</i>	61
Figura 10.	Heredograma da família com AIMAH.	69
Figura 11.	Nos pacientes com AIMAH familiar, o valor mediano do cortisol (F) sérico (linha pontilhada), durante o TSDexa, foi significativamente maior no grupo de indivíduos com o cortisol (F) salivar elevado (Grupo 2), em relação àqueles que apresentavam este último exame normal (Grupo 1); (valor mediano de 17,8 mcg/dL e 3,3 mcg/dL, respectivamente; $p = 0,016$; teste de <i>Wilcoxon-Mann-Whitney</i>).	73

Figura 12.	Nos pacientes com AIMAH familiar, o valor mediano do cortisol (F) sérico (linha pontilhada), durante o TSDexa, foi significativamente maior no grupo de indivíduos com o cortisol (F) urinário elevado (Grupo 2), em relação àqueles que apresentavam este último exame normal (Grupo 1); (valor mediano de 16,4 mcg/dL e 3,4 mcg/dL, respectivamente; $p = 0,030$; teste de <i>Wilcoxon-Mann-Whitney</i>).	73
Figura 13.	Nos pacientes com AIMAH familiar, o valor médio do cortisol (F) sérico, durante o TSDexa, foi significativamente maior no grupo de indivíduos com o ACTH plasmático baixo (< 10 pg/dL) (Grupo 2), em relação àqueles com ACTH mais elevado (≥ 10 pg/dL) (Grupo 1); (valor médio de $14,3 \pm 6,5$ mcg/dL e $3,8 \pm 2,5$ mcg/dL, respectivamente; $p = 0,005$; teste t de <i>Student</i>).	74
Figura 14.	Achados radiológicos na AIMAH familiar.	80
Figura 15.	Nos pacientes com AIMAH familiar, foi encontrada uma forte correlação positiva entre o tamanho do maior nódulo adrenal e o valor do cortisol (F) sérico, durante o TSDexa; (coeficiente de correlação de <i>Pearson</i> = 0,831; $p < 0,001$).	81
Figura 16.	Nos pacientes com AIMAH familiar, o valor médio do cortisol sérico, durante o TSDexa, foi significativamente mais alto no grupo de indivíduos com um número maior de nódulos adrenais (Grupo 2), em relação àqueles com menos nódulos (Grupo 1); (valor médio de $10,21 \pm 7,5$ mcg/dL e $3,06 \pm 0,6$ mcg/dL, respectivamente; $p = 0,045$; teste t de <i>Student</i>).	81
Figura 17.	Nos pacientes com AIMAH familiar, o tamanho mediano dos nódulos adrenais (linha pontilhada) foi significativamente maior no grupo de indivíduos com o cortisol (F) salivar elevado (Grupo 2), em relação àqueles que apresentavam este último exame normal (Grupo 1); (tamanho mediano de 3,2 cm e 2,1 cm, respectivamente; $p = 0,024$; teste de <i>Wilcoxon-Mann-Whitney</i>).	82

Figura 18.	Nos pacientes com AIMAH familiar, o tamanho médio dos nódulos adrenais foi significativamente maior no grupo de indivíduos com ACTH plasmático baixo (< 10 pg/dL) (Grupo 2), em relação àqueles com ACTH mais elevado (≥ 10 pg/dL) (Grupo1); (tamanho médio de $3,4 \pm 1,2$ cm e $2,0 \pm 0,7$ cm, respectivamente; $p = 0,041$; teste t de <i>Student</i>).	82
Figura 19.	Ressonância magnética de duas pacientes com AIMAH demonstrando lesões intracranianas típicas de meningiomas, com a impregnação intensa e homogênea pelo meio de contraste (gadolínio).	85
Figura 20.	Imagens de ^{18}F -FDG-PET/CT das três pacientes com AIMAH e síndrome de Cushing manifesta (indivíduos A, B e C).	88
Figura 21.	Imagens de ^{18}F -FDG-PET/CT dos dois pacientes com AIMAH e síndrome de Cushing subclínica (indivíduos D e E).	88
Figura 22.	Estudo de ligação genética utilizando microssatélites próximos ao gene <i>MC2R</i>	90
Figura 23.	Estudo de ligação genética utilizando microssatélites próximos ao gene <i>PRKARIA</i>	91
Figura 24.	Estudo de ligação genética utilizando microssatélites próximos ao gene <i>GNAS</i>	92
Figura 25.	Estudo de ligação genética utilizando um microssatélite próximo ao gene <i>MEN1</i>	93
Figura 26.	Estudo de ligação genética utilizando microssatélites próximos ao gene <i>APC</i>	94
Figura 27.	Estudo de ligação genética utilizando microssatélites próximos ao gene <i>FH</i>	95

Figura 28. Histograma da densidade do logaritmo da intensidade dos
arrays. 97

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Principais causas da síndrome de Cushing.	2
Tabela 2.	Receptores hormonais aberrantes acoplados à proteína G já descritos na AIMAH.	15
Tabela 3.	Dimensões usuais das adrenais normais.	40
Tabela 4.	Critérios utilizados para caracterizar o aumento das adrenais.	40
Tabela 5.	Primeiro dia de testes para a pesquisa de receptores hormonais aberrantes.	44
Tabela 6.	Segundo dia de testes para a pesquisa de receptores hormonais aberrantes.	45
Tabela 7.	Terceiro dia de testes para a pesquisa de receptores hormonais aberrantes.	46
Tabela 8.	Quarto dia de testes para a pesquisa de receptores hormonais aberrantes.	46
Tabela 9.	<i>Primers</i> utilizados para a amplificação da região codificadora do <i>MC2R</i>	53
Tabela 10.	Estudo de ligação genética utilizando microssatélites específicos.	56
Tabela 11.	<i>Primers</i> utilizados para a amplificação das regiões codificadoras dos genes <i>GPR56</i> , <i>GPR97</i> e <i>GPR114</i>	66
Tabela 12.	Propedêutica inicial dos pacientes diagnosticados com AIMAH familiar.	70
Tabela 13.	Propedêutica laboratorial complementar dos pacientes diagnosticados com AIMAH familiar.	71
Tabela 14.	Prevalência dos diferentes achados clínicos na AIMAH familiar.	75

Tabela 15.	Pacientes com TCs das adrenais normais, porém com o cortisol sérico elevado após o teste de supressão com 1 mg de dexametasona VO à meia-noite.	77
Tabela 16.	Principais achados radiológicos nas TCs das adrenais dos pacientes diagnosticados com AIMAH.	79
Tabela 17.	Resultados dos testes para a pesquisa de receptores hormonais aberrantes.	83
Tabela 18.	Principais achados do exame de ¹⁸ F-FDG-PET/CT das adrenais.	87
Tabela 19.	Avaliação da qualidade da genotipagem dos SNPs.	97
Tabela 20.	Resultados obtidos com o SIBPAL (método não paramétrico).	98
Tabela 21.	Resultados obtidos com o LODPAL (método não paramétrico).	99
Tabela 22.	Resultados obtidos com o LODLINK (método paramétrico).	100
Tabela 23.	Variantes alélicas encontradas nas regiões codificadoras e nas regiões de transição íntron-éxon dos genes <i>GPR56</i> , <i>GPR97</i> e <i>GPR114</i>	102
Tabela 24.	Genes candidatos.	104
Tabela 25.	Famílias já descritas com AIMAH.	106

Resumo

Alencar GA. *Aspectos clínicos e moleculares da hiperplasia adrenal macronodular independente de ACTH em sua forma familiar* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: A hiperplasia adrenal macronodular independente de ACTH (AIMAH) é uma doença rara, caracterizada pela presença de macronódulos funcionantes nas adrenais e por uma produção aumentada, autônoma e sustentada de cortisol. Constitui uma causa incomum de síndrome de Cushing (SC). A forma esporádica da doença parece ser a mais frequente, no entanto, se desconhece a real prevalência de sua forma familiar. Apesar de ser uma entidade clínica conhecida há quase 50 anos, o processo fisiopatológico que culminaria com a AIMAH, as alterações genéticas predisponentes e aspectos clínicos, laboratoriais e radiológicos relevantes da doença ainda não foram elucidados de forma clara. O diagnóstico recente de uma grande família portadora da doença viabilizou a realização do presente trabalho. **OBJETIVOS:** 1) Caracterizar a evolução da AIMAH em sua forma familiar, correlacionando as manifestações clínicas, os dados laboratoriais e os achados radiológicos; 2) investigar a possível associação entre a AIMAH e a ocorrência de meningiomas intracranianos; 3) avaliar a atividade metabólica das adrenais hiperplasiadas na AIMAH; 4) definir o padrão de herança genética da doença na família estudada; e 5) mapear regiões cromossômicas e loci potencialmente relacionados à etiologia genética da AIMAH familiar. **MÉTODOS:** 96 membros da família estudada foram inicialmente submetidos a uma avaliação clínica e laboratorial pormenorizada. Em seguida, foram realizados exames de tomografia computadorizada para a caracterização radiológica das adrenais. Exames de ressonância magnética e de tomografia por emissão de pósitrons com fluordesoxiglicose marcada, acoplada à tomografia computadorizada (^{18}F -FDG-PET/CT) foram realizados em pacientes com as formas familiar e esporádica da doença para, respectivamente, investigar a presença de meningiomas intracranianos e caracterizar a atividade metabólica das adrenais hiperplasiadas. Foram também realizados testes *in vivo* para a pesquisa de receptores hormonais aberrantes nos pacientes com a forma familiar da doença. Em uma outra etapa do estudo, diferentes técnicas de biologia molecular foram empregadas para a investigação da etiologia genética da AIMAH familiar. Desta forma, realizou-se: o sequenciamento do gene do receptor do ACTH (*MC2R*), um estudo de ligação genética utilizando microssatélites específicos, um estudo de ligação genética em escala genômica utilizando polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e o sequenciamento de genes suspeitos. **RESULTADOS:** A avaliação dos indivíduos pertencentes à genealogia permitiu o diagnóstico de 15 casos da doença (7 mulheres e 8 homens) em três gerações consecutivas. A AIMAH era transmitida para as gerações subsequentes tanto pelo sexo masculino como feminino e acometia cerca de metade dos irmãos em alguns segmentos da família. A idade média ao diagnóstico da doença foi de $52,8 \pm 11,3$ anos (32 a 74 anos) e cerca de 86% (12/14) desses pacientes apresentavam SC subclínica. As dosagens do cortisol salivar à meia-noite e do cortisol em urina de 24 horas demonstraram baixa sensibilidade (21% e 14%, respectivamente) para o diagnóstico da doença em sua forma familiar. O valor do ACTH plasmático encontrava-se baixo (< 10 pg/mL) em 46% (5/11) dos pacientes doentes. Em cerca de 62% (8/13) dos casos, foi demonstrada uma redução do valor sérico do sulfato de desidroepiandrosterona (SDHEA). Por regressão logística simples, foi observado que

a probabilidade (*odds ratio*) de um indivíduo apresentar a doença na família era maior diante da presença de pletora, após o diagnóstico de diabetes ou pré-diabetes ou diante do relato de ganho ponderal progressivo. O espessamento de ambas as adrenais associado à presença de nódulos bilaterais foi o achado radiológico mais frequente na forma familiar da doença. No entanto, em um terço dos pacientes (5/15) foram encontradas alterações radiológicas em somente uma das adrenais. Durante os testes *in vivo* para pesquisa de receptores hormonais aberrantes, foram observadas, com frequência, respostas distintas entre os indivíduos doentes pertencentes à família. Nos pacientes submetidos ao exame de ressonância magnética, foram demonstradas imagens típicas de meningiomas intracranianos em um terço (5/15) dos casos. No exame ^{18}F -FDG-PET/CT, foi observado um aumento da atividade metabólica das adrenais hiperplasiadas, tanto nos pacientes com SC manifesta como naqueles com a forma subclínica da doença. O estudo molecular permitiu delimitar nos cromossomos 16 e 11 algumas regiões genômicas potencialmente relacionadas à etiologia genética da AIMAH familiar. O sequenciamento de alguns genes suspeitos (*GPR56*, *GPR97* e *GPR114*), localizados nessas regiões, não demonstrou a presença de mutações. **CONCLUSÕES:** Na genealogia estudada, o padrão de transmissão da AIMAH foi autossômico dominante, e a SC subclínica foi a forma mais frequente de manifestação da doença. O teste de supressão com 1 mg de dexametasona via oral à meia-noite demonstrou ser o exame laboratorial de escolha para a avaliação inicial dos pacientes suspeitos de apresentarem AIMAH familiar, em função, sobretudo, da baixa sensibilidade do cortisol salivar à meia-noite e do cortisol urinário para o diagnóstico da doença. Valores normais do ACTH plasmático foram um achado laboratorial frequente na AIMAH familiar e valores baixos do SDHEA sérico demonstraram ser um indício relativamente precoce da SC subclínica associada à doença. Diferentes padrões radiológicos foram demonstrados nas tomografias das adrenais dos pacientes com AIMAH familiar, não sendo infrequente a presença de assimetria entre as duas glândulas. Os resultados dos testes *in vivo* para a pesquisa de receptores hormonais aberrantes foram mais condizentes com a hipótese de que a expressão desses receptores seria um epifenômeno do processo fisiopatológico, resultante da proliferação e desdiferenciação celular. Uma alta prevalência de meningiomas intracranianos foi observada nos pacientes com AIMAH, tanto na forma familiar da doença como na forma esporádica. Demonstrou-se também, pela primeira vez, que as adrenais na AIMAH podem exibir uma captação aumentada de ^{18}F -FDG no exame de PET/CT, de forma semelhante às metástases e aos carcinomas da glândula. Por fim, foram delimitadas no cromossomo 16 (16p12.1, 16p11.2, 16q12.1, 16q13 e 16q21) e no cromossomo 11 (11q23.1) as principais regiões do genoma suspeitas de estarem ligadas à etiologia genética da AIMAH familiar (genoma de referência: NCBI36/hg18).

Descritores: 1.Hiperplasia adrenal macronodular independente de ACTH familiar; 2.Síndrome de Cushing/diagnóstico; 3.Síndrome de Cushing/etiologia; 4.Síndrome de Cushing/genética; 5.Sinais e sintomas; 6.Tomografia; 7.Tomografia por emissão de pósitrons e tomografia computadorizada; 8.Meningioma; 9.Receptores de superfície celular; 10.Técnicas de genotipagem; 11.Ligação genética 12.Polimorfismo de nucleotídeo único.

Summary

Alencar GA. *Clinical and molecular aspects of familial ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

INTRODUCTION: ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH) is a rare disease characterized by functioning adrenal macronodules and increased, autonomous and sustained cortisol production. This condition is an uncommon cause of Cushing's syndrome (CS). While the sporadic form of the disease appears to be the most frequent, the true prevalence of its familial form is unknown. Despite being a known clinical entity for almost 50 years, the pathophysiological process that leads to AIMAH, the predisposing genetic alterations and important clinical, laboratory and radiological aspects of the disease have not been fully clarified. The recent identification of a large group of relatives with familial AIMAH allowed the accomplishment of the present study. **OBJECTIVES:** The following were the aims of this study: 1) characterize the development of familial AIMAH through correlations between clinical manifestations, laboratory data and radiological findings; 2) investigate the possible association between AIMAH and the occurrence of intracranial meningioma; 3) characterize the metabolic activity of the adrenal glands in this disease; 4) define the inheritance pattern of the disease in the family studied; and 5) map chromosomal regions and loci potentially related to the genetic etiology of familial AIMAH. **METHODS:** 96 members of the family studied were initially subjected to a detailed clinical and laboratory evaluation. Computed tomography (CT) scans were performed for the radiological characterization of the adrenal glands. Magnetic resonance imaging scans and ^{18}F -fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography (^{18}F -FDG-PET/CT) scans were performed on patients with both forms of the disease (familial and sporadic) to investigate the presence of intracranial meningioma and characterize the metabolic activity of the adrenal glands, respectively. *In vivo* studies for aberrant hormone receptors were also conducted on those patients with familial AIMAH. In another phase of the study, different molecular biology techniques were employed to investigate the genetic etiology of familial AIMAH. For such, sequencing of the ACTH receptor gene (*MC2R*), a linkage study using specific microsatellite markers, a single nucleotide polymorphism (SNP)-based genome-wide linkage study and the sequencing of suspect genes were performed. **RESULTS:** The evaluation of the family revealed the diagnosis of 15 cases of the disease (7 women and 8 men) in three consecutive generations. AIMAH was transmitted to subsequent generations by both genders and half of the siblings were affected in some segments of the family. Mean age at diagnosis was 52.8 ± 11.3 years (range: 32 to 74 years) and about 86% (12/14) of the patients exhibited subclinical CS. Both midnight salivary cortisol and 24-hour urinary cortisol demonstrated low sensitivity (21% and 14%, respectively) for the diagnosis of familial AIMAH. Plasma ACTH levels were low (< 10 pg/ml) in 46% (5/11) of patients with the disease. In about 62% (8/13) of cases, serum dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) levels were below the normal range. Simple logistic regression models revealed that the probability (odds ratio) of an individual having the disease in the family was greater in the presence of plethora, progressive weight gain or after the diagnosis of diabetes or prediabetes. Adrenal thickening associated with the presence of bilateral nodules was the most common

radiological finding in familial AIMAH. However, radiological abnormalities were found in only one of the adrenal glands in one third of the patients (5/15). Throughout the *in vivo* studies for aberrant hormone receptors, distinct responses were frequently observed among the individuals with familial AIMAH. One third (5/15) of the patients who underwent magnetic resonance imaging scans had typical images of intracranial meningiomas. The ^{18}F -FDG-PET/CT scan revealed increased metabolic activity of the hyperplastic adrenals in patients with both overt and subclinical CS. The molecular studies delimited genomic regions on chromosomes 16 and 11 potentially related to the genetic cause of familial AIMAH. Some suspected genes (*GPR56*, *GPR97* and *GPR114*), located in these genomic regions, were sequenced, but no mutations were found. **CONCLUSIONS:** In the extended family studied, AIMAH followed an autosomal dominant pattern of inheritance and subclinical CS was the most common presentation of the disease. The 1 mg overnight dexamethasone suppression test proved to be the screening test of choice for the initial evaluation of patients suspected to have familial AIMAH, due mainly to the low sensitivity of midnight salivary cortisol and 24-hour urinary cortisol as screening tests. A normal level of plasma ACTH was a common laboratory finding in familial AIMAH. Low serum levels of DHEAS proved to be a relatively early finding associated with the subclinical CS determined by the disease. Adrenal CT scans revealed different radiological patterns among patients with familial AIMAH, with a fairly frequent rate of asymmetry between glands. The distinct responses observed throughout the *in vivo* studies for aberrant hormone receptors, among family members, favor the hypothesis that these receptors may be an epiphenomenon resulting from cell proliferation and dedifferentiation. An increased prevalence of intracranial meningioma was demonstrated in both the familial and sporadic forms of AIMAH. For the first time, it was shown that AIMAH may exhibit increased ^{18}F -FDG uptake on the PET/CT scan, similarly to adrenal carcinoma and metastasis. The main genomic regions potentially associated with familial AIMAH were delimited on chromosome 16 (16p12.1, 16p11.2, 16q12.1, 16q13 and 16q21) and chromosome 11 (11q23.1) (reference genome: NCBI36/hg18).

Descriptors: 1.Familial ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia; 2.Cushing's syndrome/diagnosis; 3.Cushing's syndrome/etiology; 4.Cushing's syndrome /genetics 5.Signs and symptoms; 6.Tomography; 7.Positron-emission tomography and computed tomography; 8.Meningioma; 9.Receptors, cell surface; 10.Genotyping techniques; 11.Genetic linkage; 12.Polymorphism, single nucleotide.

1 Introdução

1.1 Síndrome de Cushing

Descrita pela primeira vez por Harvey Cushing em 1932 (1), a síndrome de Cushing (SC) consiste em um estado clínico resultante da exposição prolongada e inapropriada do organismo a quantidades excessivas de glicocorticoides (2). A SC pode decorrer da administração exógena prolongada de glicocorticoides (causa mais frequente) ou da secreção aumentada desses hormônios pelo córtex adrenal (SC endógena).

As diferentes causas da SC podem ser classificadas como dependentes ou independentes do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Tabela 1). Na população adulta, 15-20% dos casos de SC endógena são independentes do ACTH, com o predomínio das lesões unilaterais, sob a forma de adenomas e carcinomas (90-95%). As lesões bilaterais são menos comuns e incluem a hiperplasia adrenal macronodular independente de ACTH (AIMAH), a doença adrenocortical nodular pigmentada primária (PPNAD), a síndrome de McCune-Albright e os raros adenomas e carcinomas bilaterais (3, 4).

Tabela 1. Principais causas da síndrome de Cushing.

		Proporção
ACTH-dependente	Doença de Cushing	70%
	Síndrome do ACTH ectópico	10%
	Adenoma adrenal	10%
ACTH-independente	Carcinoma adrenal	5%
	AIMAH	< 2%
	PPNAD	< 2%
	Síndrome de McCune-Albright	< 2%

Adaptado de Newell-Price *et al.* (4).

1.2 Hiperplasia adrenal macronodular independente de ACTH

A AIMAH é uma causa rara de SC, estima-se que represente menos de 2% dos casos (4, 5). Descrita pela primeira vez em 1964 por Kirschner *et al.* (6), caracteriza-se pela presença de macronódulos funcionantes nas adrenais e por uma produção aumentada, autônoma e sustentada de cortisol.

A forma esporádica de apresentação da AIMAH parece ser a mais frequente (7). No entanto, já foram descritas na literatura 14 famílias com a forma herdada da doença (8-19). A real prevalência da forma familiar da AIMAH ainda não é bem conhecida, pois, habitualmente, não é realizada uma avaliação sistemática dos parentes dos indivíduos portadores da doença. (7). Suspeita-se que, nas famílias com AIMAH, o padrão de transmissão da doença seja autossômico dominante; no entanto, nenhuma das genealogias estudadas, até o momento, demonstrou ser muito informativa, sendo poucos os indivíduos amplamente avaliados na maioria delas (8-18). Desta forma, o conhecimento que se tem sobre os aspectos clínicos, laboratoriais e radiológicos da AIMAH está fundamentado sobretudo no estudo dos casos esporádicos.

Recentemente, foram diagnosticadas duas famílias com AIMAH na Unidade de Suprarrenal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Uma delas representa a maior genealogia com AIMAH diagnosticada até o momento. Diante de uma casuística representativa, o estudo da AIMAH familiar representa uma grande oportunidade para a melhor compreensão dos aspectos clínicos, laboratoriais e radiológicos relevantes, para o esclarecimento da fisiopatologia e evolução da doença e para a investigação das alterações genéticas predisponentes.

1.2.1 Características clínicas e laboratoriais

A AIMAH parece distribuir-se igualmente entre os dois gêneros e na maioria dos casos, torna-se clinicamente manifesta por volta da quinta a sexta décadas de vida, em contraposição à maioria das causas de SC que predominam no sexo feminino e têm apresentação clínica geralmente mais precoce (20-22).

Até recentemente, acreditava-se que a AIMAH se expressasse sobretudo sob a forma de uma SC clássica (manifesta) (21). Atualmente, supõe-se que SC subclínica seja a forma mais frequente de manifestação da doença, porém, subdiagnosticada (7). Em grande parte dos pacientes com AIMAH, os sinais e sintomas decorrentes do hipercortisolismo são discretos. Nos pacientes com a forma subclínica da doença, evidencia-se geralmente ao diagnóstico: a perda do ritmo circadiano normal do cortisol, com a elevação do cortisol sérico e salivar à meia-noite; a ausência da supressão normal do cortisol sérico, durante o teste de supressão noturna com 1 mg de dexametasona via oral (VO) à meia-noite (TSDexa); o valor parcialmente supresso do ACTH plasmático; e o cortisol urinário normal (7, 23). Nos pacientes com AIMAH e SC clássica, o ACTH plasmático habitualmente está suprimido e o cortisol urinário elevado. O diagnóstico incidental da AIMAH também tem sido observado com mais frequência, diante da maior disponibilidade de exames radiológicos, sobretudo nas últimas décadas (7, 21, 24).

A evolução clínica da AIMAH parece ocorrer de forma lenta e insidiosa. Ohashi *et al.* (25) relataram o caso de um paciente com AIMAH que levou sete anos para progredir da SC subclínica à SC clássica. Swain *et al.* (26) descreveram uma série com nove pacientes com a forma esporádica da doença. O tempo médio entre o aparecimento das primeiras manifestações clínicas e o diagnóstico da AIMAH nesses

pacientes foi de cerca de 8 anos. É importante destacar que a história natural da AIMAH ainda não é bem compreendida, não se sabe, por exemplo, se necessariamente todos os pacientes evoluíram para a SC clássica ao longo dos anos.

Embora o crescimento da adrenal na AIMAH ocorra independente do estímulo do ACTH, o receptor desse hormônio (MC2R) permanece expresso na glândula hiperplasiada. Desta forma, após o estímulo *in vivo* com o ACTH sintético (tetracosactida), ocorre um incremento significativo da síntese do cortisol na AIMAH. Esse achado permite diferenciar a doença de outras condições, também associadas ao aumento bilateral das adrenais, tais como metástases e doenças infiltrativas (7, 20). É importante mencionar que, em alguns casos isolados de AIMAH, concomitantemente à síntese de cortisol, foi descrita a secreção de outros hormônios pela adrenal hiperplasiada, entre eles, mineralocorticoides, andrógenos e estrona; tais associações, no entanto, parecem ser incomuns (27-30).

Em 2005, Lee *et al.* (15) descreveram a ocorrência de meningiomas intracranianos em duas irmãs com AIMAH. Os meningiomas são neoplasias derivadas das células aracnoideas, correspondem a cerca de 30% dos tumores cerebrais primários, sendo em sua grande maioria benignos (31). A incidência anual de meningiomas na população é de cerca 4,5 casos para cada 100 mil indivíduos. Esses tumores ocorrem mais comumente em pacientes idosos, sobretudo a partir da sétima década de vida e são duas vezes mais frequentes no sexo feminino (31). As alterações genéticas mais frequentemente relacionadas aos meningiomas foram identificadas na região cromossômica 22q12.2. O principal gene dessa região, denominado *neurofibromin 2 (NF2)*, é um gene supressor tumoral que codifica uma proteína de mesmo nome (31, 32). Cerca de 50% dos meningiomas esporádicos e

praticamente todos os meningiomas relacionados à neurofibromatose do tipo 2 demonstram mutações nesse gene (33). Outros genes potencialmente relacionados à etiopatogênese dos meningiomas também têm sido descritos nessa e em outras regiões cromossômicas (34). Fundamentado no caso específico das duas pacientes supracitadas, já fora aventada a possibilidade de uma associação entre a AIMA e a ocorrência de meningiomas intracranianos; no entanto, nenhum trabalho investigou de forma sistemática a possível relação das duas entidades.

1.2.2 Características radiológicas

A tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética (RM) habitualmente evidenciam na AIMA o aumento de ambas as glândulas adrenais, associado à presença de nódulos bilaterais de cerca de 1-5 cm de diâmetro (7, 20, 22). O aumento difuso das adrenais sem a distinção nítida dos nódulos, bem como a presença de assimetria entre as duas glândulas já foram descritos, podendo dificultar o diagnóstico correto da doença. Além disso, os macronódulos podem distorcer o parênquima adrenal normal, não permitindo, em alguns casos, a sua visualização (20, 35). Na TC pós-contraste, geralmente é descrito na AIMA um reforço da imagem radiológica (22, 36), embora esse achado tenha sido recentemente questionado (37). Na RM, nas sequências ponderadas em T1, as adrenais hiperplasiadas apresentam-se hipointensas em relação ao fígado e isointensas em relação ao músculo. Já nas sequências ponderadas em T2, as adrenais na AIMA geralmente mostram-se hiperintensas em relação ao fígado, contrastando com a imagem da hiperplasia adrenal dependente de ACTH, que se mostra isointensa (16, 36-38). Geralmente, é descrita na AIMA a perda de sinal nas imagens obtidas em uma sequência fora de

fase (técnica de *chemical-shift*), o que é compatível com um maior teor intracelular de lipídeos (16, 36). Mais recentemente, no entanto, foi demonstrado que em alguns casos da doença pode não ocorrer a perda de sinal com essa técnica (37). Na cintilografia com iodo-131-6 β -iodometil-19-norcolesterol geralmente observa-se na AIMAH uma captação adrenal bilateral do radiotraçador (36-38).

Recentemente, alguns trabalhos têm sugerido que a tomografia por emissão de pósitrons (PET) com fluordesoxiglicose marcada (^{18}F -FDG) acoplada à tomografia computadorizada (^{18}F -FDG-PET/CT) poderia ser útil na diferenciação das lesões adrenais malignas e benignas (39, 40). A ^{18}F -FDG-PET/CT tem sido utilizada como ferramenta adicional aos métodos de TC e RM, por permitir avaliar concomitantemente a anatomia da adrenal e sua atividade metabólica. Normalmente, os carcinomas adrenais possuem um alto metabolismo glicolítico e, conseqüentemente, uma captação maior de ^{18}F -FDG em relação aos adenomas, cuja atividade metabólica é menor. Desta forma, o valor padrão de captação máxima (SUVmax), parâmetro utilizado para quantificar a captação da ^{18}F -FDG, costuma estar mais elevado nos carcinomas e nas metástases adrenais do que nos adenomas da glândula (41). Metser *et al.* (39) utilizaram um SUVmax igual a 3,1 como ponto de corte para diferenciar as lesões adrenais malignas (SUVmax > 3,1) das benignas (SUVmax $\leq$ 3,1), obtendo uma sensibilidade de 98,5% e uma especificidade de 92% na distinção dessas lesões. Recentemente, Boland *et al.* (40) sugeriram que uma avaliação subjetiva da atividade de ^{18}F -FDG da lesão adrenal poderia ser útil. As lesões adrenais malignas apresentariam uma atividade de ^{18}F -FDG aumentada em relação ao fígado e as lesões adrenais benignas, uma atividade igual ou inferior à desse órgão. Tessonnier *et al.* (42), por sua vez, propuseram a utilização da razão

SUVmax da lesão / SUVmax do fígado para a diferenciação das lesões adrenais. Utilizando o valor de 1,8 como ponto de corte, eles foram capazes de discriminar as lesões adrenais malignas e benignas com uma sensibilidade e especificidade de 100%. Até o presente estudo, não havia na literatura nenhum trabalho descrevendo o padrão de captação da ^{18}F -FDG na AIMAH. Desta forma, até recentemente, o metabolismo glicolítico dos nódulos adrenais hiperplasiados ainda não havia sido caracterizado.

1.2.3 Anatomopatológico

A AIMAH é um processo benigno, não havendo na literatura nenhum relato de transformação maligna das lesões (7, 43). À macroscopia, geralmente observa-se a presença de múltiplos nódulos adrenais de coloração amarelada, em função do alto conteúdo de lipídios. Nas adrenais normais, o peso combinado das duas glândulas varia geralmente de 8 a 12 g; na AIMAH, o peso somado das adrenais é habitualmente maior que 60 g, podendo cada glândula pesar mais de 200 g. Na SC dependente de ACTH, o aumento das adrenais costuma ser mais modesto, com um peso combinado das glândulas normalmente menor que 30 g (22). O exame microscópico das adrenais na AIMAH revela a presença de múltiplos nódulos de aspecto homogêneo, constituídos predominantemente por dois grupos celulares distintos: um formado por células de citoplasma claro (ricas em lipídios), dispostas em cordões; e outro constituído por células de citoplasma compacto (pobre em lipídios), dispostas em estruturas semelhantes a ninhos ou ilhas (44, 45). Estudos utilizando hibridização *in situ* e imuno-histoquímica demonstraram uma expressão diferente das enzimas esteroidogênicas na AIMAH, um achado não relatado em

outras patologias adrenocorticais. A enzima 3β -hidroxiesteroide desidrogenase do tipo 2 (3β -HSD2) é expressa exclusivamente nas células grandes de citoplasma claro e a enzima 17α -hidroxilase/ $17,20$ -liase (CYP17A1) é expressa sobretudo nas células pequenas de citoplasma compacto (45). As demais enzimas esteroidogênicas estão presentes nos dois tipos celulares; entretanto, algumas delas têm sua expressão reduzida, corroborando a hipótese de que a síntese de esteroides na AIMAH seria pouco eficaz (45, 46). Desta forma, o hipercortisolismo na AIMAH decorreria, mais provavelmente, do aumento do número de células adrenocorticais e não de uma esteroidogênese eficiente. Uma controvérsia existente em relação ao exame histopatológico é o aspecto do córtex da região internodular, alguns autores relatam a hipertrofia, e outros, a atrofia dessa região (5, 8, 26, 44).

1.2.4 Fisiopatologia e mecanismos moleculares da AIMAH

A sequência de eventos e os mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento da AIMAH ainda não foram elucidados de forma clara. Os avanços até então alcançados na compreensão da fisiopatologia da doença serão debatidos a seguir.

1.2.4.1 Autonomia do córtex adrenal

Uma das primeiras hipóteses aventadas para explicar a patogênese da AIMAH defendia que a estimulação crônica do córtex adrenal pelo ACTH (doença de Cushing de longa duração ou síndrome do ACTH ectópico) poderia levar à hiperplasia progressiva das adrenais. A posterior aquisição de autonomia pelas glândulas hiperplasiadas, determinaria, em uma segunda etapa, a supressão do

próprio ACTH (47). Primeiramente, são raros os casos descritos de autonomia da glândula adrenal como resultado do estímulo crônico do ACTH (24, 48). Além disso, não foi relatado nenhum caso de síndrome de Nelson nos pacientes com AIMAH submetidos à adrenalectomia bilateral, o que torna esta hipótese improvável (21, 26, 43).

1.2.4.2 Regulação anormal do córtex adrenal por receptores hormonais aberrantes

Em situações normais, o ACTH é o principal regulador da síntese de cortisol e de andrógenos pelo córtex adrenal. O receptor do ACTH (MC2R) pertence à família dos receptores acoplados à proteína G. Ele apresenta sete regiões transmembrana e um domínio carboxiterminal citoplasmático que interage com essa proteína. A proteína G, em seu estado inativado, constitui um heterotrímero formado pelas subunidades alfa (α) ligada a uma molécula de guanidina difosfato (GDP), beta (β) e gama (γ) (Figura 1) (20, 43, 49).

Figura 1. Regulação normal do córtex adrenal mediada pelo ACTH. Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH); receptor do ACTH (MC2R); proteína acessória do MC2R (MRAP); subunidade alfa da proteína G estimulatória ($G_{s\alpha}$); subunidade beta (β); subunidade gama (γ); adenosina trifosfato (ATP); adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc); elemento responsivo ao AMPc (CRE); proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc (CREB); proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR), colesterol desmolase (CYP11A1).

Extraído de Arlt *et al.* (49).

Em condições fisiológicas, quando a molécula de ACTH se liga ao MC2R no córtex adrenal, esse receptor altera sua conformação estrutural e ativa uma proteína G estimulatória (proteína Gs), o que determina a dissociação da subunidade α do GDP e sua ligação à guanidina trifosfato (GTP). Uma vez que o GTP está acoplado à subunidade α , essa última assume sua conformação ativada, ela se separa do receptor e do dímero $\beta\gamma$ e ativa seu respectivo efetor, a adenilato ciclase (AC). A AC catalisa a conversão da adenosina trifosfato (ATP) em adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) e, na sequência, o AMPc ativa a proteína cinase A (PKA). A via de sinalização da PKA vai estimular a esteroidogênese adrenal de três formas distintas: por meio do aumento da internalização celular dos ésteres de colesterol; por

intermédio da ativação da lipase sensível a hormônio, com a consequente incorporação mitocondrial do colesterol; e por meio da fosforilação da proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc (CREB), um fator de transcrição que vai estimular a expressão do gene da colesterol desmolase (*CYP11A1*) e de outras enzimas esteroidogênicas. A atividade GTPase intrínseca da subunidade α da proteína G controla o término do sinal celular por meio da clivagem do GTP para GDP. Desta forma, a subunidade α dissocia-se do efector e liga-se novamente ao dímero $\beta\gamma$ e ao receptor, assumindo a proteína G novamente sua forma heterotrimérica inativa (20, 43). Recentemente, foi demonstrado que duas proteínas acessórias seriam essenciais para o transporte do MC2R até a superfície celular e para a transdução do sinal desse receptor de membrana. Essas proteínas, que interagem diretamente com o MC2R, são denominadas proteína acessória do MC2R (MRAP) e proteína acessória 2 do MC2R (MRAP2) (49-51).

Na AIMAH, alguns pesquisadores defendem que a síntese de cortisol ocorreria independente do estímulo do ACTH, regulada por receptores hormonais aberrantes. São definidos como receptores hormonais aberrantes ou ilícitos os receptores ectópicos ou eutópicos do córtex adrenal que, inapropriadamente, estimulariam a esteroidogênese e a hiperplasia da glândula. Esses receptores, em sua grande maioria, pertencem à família dos receptores transmembrana acoplados à proteína G (Figura 2) (52-54).

Figura 2. Regulação anormal do córtex adrenal mediada por receptores hormonais aberrantes (ilícitos). Diferentes hormônios, tais como: o peptídeo inibitório gástrico (GIP), a epinefrina (E), a norepinefrina (NE), o hormônio luteinizante (LH), a gonadotrofina coriônica humana (hCG), a serotonina e a vasopressina, ligar-se-iam aos seus respectivos receptores aberrantes de membrana (eutópicos ou ectópicos), acoplados à proteína G (Gs, Gq ou Gi), determinando a ativação da via de sinalização mediada pela adenilato ciclase (AC), pela adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) e pela proteína cinase A (PKA). A ativação dessa via levaria à fosforilação de uma série de fatores de transcrição (TF), culminando com a expressão das enzima esteroidogênicas, com a síntese de cortisol e hiperplasia das adrenais. Receptor do ACTH (ACTHR); receptor V1 da vasopressina (V1R); fosfolipase C (PLC); diacilglicerol (DAG); inositol trifosfato (IP₃); proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR); colesterol desmolase (CYP11A1); 17α-hidroxilase/17,20-liase (CYP17A1); 3β-hidroxiesteroide desidrogenase do tipo 2 (3β-HSD2); 21-hidroxilase (CYP21A2); 11β-hidroxilase (CYP11B1); núcleo (N); mitocôndria (M).

Adaptado de Lacroix *et al.* (54).

O conceito da presença de receptores hormonais aberrantes (ilícitos) nas adrenais foi proposto, pela primeira vez, em 1971 por Schorr *et al.* (55). Eles conduziram um estudo *in vitro* com células provenientes de carcinoma adrenal de rato, produtor de corticosterona e demonstraram que, além do ACTH, outros hormônios como catecolaminas e TSH eram capazes de estimular a atividade da adenilato ciclase no tecido. Posteriormente, outros estudos *in vitro* demonstraram o acoplamento funcional de outros receptores hormonais de membrana em adenomas e carcinomas adrenocorticais, inclusive em humanos (20, 53). Em 1987, Hamet *et al.* (56) descreveram o caso de um paciente com síndrome de Cushing, decorrente de um adenoma adrenal, cuja síntese de cortisol estava acoplada à ingestão de alimentos. A partir desse momento, o conceito de receptores hormonais aberrantes começava a ganhar significado clínico. Alguns anos mais tarde, dois grupos independentes demonstraram a produção anormal de cortisol, associada à ingestão oral de alimentos, em indivíduos com AIMAH (57, 58). Nesses pacientes, o hipercortisolismo era induzido por um hormônio gastrointestinal, o GIP (peptídeo inibitório gástrico ou peptídeo insulínico dependente de glicose). Desde então, vários trabalhos têm demonstrado que em diversos casos de AIMAH e em alguns adenomas e carcinomas adrenais, a esteroidogênese pode ser estimulada por outros hormônios que não o ACTH (52-54, 59). Desta forma, atualmente, aventa-se a hipótese de que na AIMAH a síntese de cortisol independente do ACTH seria induzida por hormônios que se ligariam aos seus respectivos receptores aberrantes de membrana, acoplados à proteína G, em sua maioria (Tabela 2).

Tabela 2. Receptores hormonais aberrantes acoplados à proteína G já descritos na AIMAH.

Receptor aberrante	Estudos moleculares conduzidos na AIMAH
Receptor do GIP (52, 57, 58, 60)	Não foram encontradas mutações no gene desse receptor ou em sua região promotora. A expressão dos fatores de transcrição Sp1, Sp3 e CRSP9, associados ao gene do receptor, também não estava alterada (52, 61-63).
Receptores V1, V2 e V3 da vasopressina (52, 64, 65)	Não foram encontradas mutações no gene do receptor V1 e não há descrição de mutações nos genes dos outros dois receptores (52, 66).
Receptor β -adrenérgico (52, 67)	Não há descrição de mutação no gene desse receptor.
Receptor do hormônio luteinizante (LH/hCGR) (52, 65, 68)	Não foram encontradas mutações no <i>LH/hCGR</i> (59).
Receptores 5-HT4 e 5-HT7 da serotonina (52, 65)	Não foram encontradas mutações no gene do receptor 5-HT4 e não há descrição de mutação no receptor 5-HT7 (69).
Receptor AT-1 da angiotensina II (52)	Não há descrição de mutação no gene desse receptor.
Receptor do glucagon (65, 70)	Não há descrição de mutação no gene desse receptor.
Proteína da especificidade 1 (SP1); proteína da especificidade 3 (SP3); e cofator requerido para a ativação transcricional de SP1, subunidade 9 (CRSP9).	

Os mecanismos moleculares responsáveis pela expressão dos receptores aberrantes na AIMAH são desconhecidos. Conforme comentado acima, nas adrenais hiperplasiadas esses receptores não se encontram mutados, embora estejam hiperexpressos em alguns casos.

Alguns autores defendem a hipótese de que a expressão dos receptores aberrantes seria um evento inicial e essencial na patogênese da AIMAH (54). Corroboram essa hipótese: a presença dos receptores aberrantes na grande maioria dos casos de AIMAH, mesmo em fases iniciais da doença (65, 71); a demonstração da ocorrência de esteroidogênese *in vitro* na AIMAH, após o estímulo com diferentes hormônios (72); a relação temporal documentada entre o hipercortisolismo e os

níveis elevados de LH/hCG na gestação e no climatério, em algumas pacientes (68); e os experimentos demonstrando que a transfecção do receptor do GIP ou do receptor do LH/hCG para células adrenais de animais pode determinar a hiperplasia da glândula e hipercortisolismo *in vivo* (73, 74).

Por outro lado, aventa-se também a hipótese de que a presença dos receptores aberrantes seria um epifenômeno, resultante da proliferação e desdiferenciação celular (43). De fato, na grande maioria das vezes, a utilização dos antagonistas dos receptores aberrantes não permite o controle sustentado do hipercortisolismo *in vivo*, ou mesmo, a reversão da hiperplasia da glândula. Além disso, em um estudo conduzido por Swords *et al.* (75) foi demonstrado que na hiperplasia adrenal dependente de ACTH (doença de Cushing) também pode ocorrer uma expressão aumentada do receptor aberrante do GIP. As culturas de células adrenais desses pacientes apresentavam, inclusive, uma resposta *in vitro* ao estímulo com esse hormônio. Foi sugerido que o estímulo crônico da adrenal pelo ACTH ou a ativação constitutiva de sua via de sinalização estariam associados à expressão aberrante do receptor do GIP. No entanto, esses achados não foram confirmados por Antonini *et al.* (76). Nesse grupo, diferentemente do anterior, não foi encontrada uma expressão significativa do receptor do GIP nos pacientes com doença de Cushing. Essa questão, de relevância para a compreensão da fisiopatologia da AIMAH, permanece não esclarecida.

Partindo-se do pressuposto de que os receptores aberrantes teriam um papel primordial para o início e progressão da AIMAH, seria esperado que os indivíduos doentes, pertencentes a uma mesma família, expressassem os mesmos receptores aberrantes de membrana, inclusive em uma fase precoce da doença. Essa última

hipótese, no entanto, ainda não foi avaliada de forma convincente, o que somente seria factível mediante o estudo de uma grande genealogia com AIMAH familiar.

1.2.4.3 Mutação do receptor do ACTH (MC2R)

O gene do receptor do ACTH denominado *melanocortin 2 receptor (MC2R)* (OMIM 607397) está localizado no cromossomo 18p11.21. A hipótese de que uma mutação ativadora desse gene poderia levar a uma ativação constitutiva de sua via de sinalização e, conseqüentemente, à autonomia da glândula adrenal já fora investigada (77, 78). Demonstrou-se, no entanto, ser essa uma causa extremamente incomum de AIMAH. Até o momento, em somente dois pacientes foram encontradas mutações ativadoras do *MC2R* e apenas um deles apresentava o diagnóstico de AIMAH. Em 2002, Swords *et al.* (79) realizaram um estudo funcional *in vitro* demonstrando que a mutação p.Phe278Cys do *MC2R*, previamente descrita em homozigose em um paciente com AIMAH, determinava o aumento da atividade basal desse receptor (elevação do AMPc) e inibia sua dessensibilização e internalização. Em outro estudo funcional *in vitro* conduzido pelos mesmos pesquisadores, foi demonstrado que duas mutações concomitantes no *MC2R* (p.Cys21Arg e p.Ser247Gly) eram capazes de ativar constitutivamente o receptor. Essas últimas mutações ocorriam em um mesmo alelo, em um paciente com hipersensibilidade ao ACTH (80, 81). Em ambos os pacientes supracitados, as mutações encontradas eram germinativas.

1.2.4.4 Mutação da subunidade alfa da proteína Gs

O gene que codifica a subunidade alfa da proteína Gs é denominado *GNAS complex locus (GNAS)* (OMIM 139320) e está localizado no cromossomo 20q13.32

(82). A síndrome de McCune-Albright é causada por mutações pós-zigóticas (somáticas) ativadoras desse gene. Essas mutações, também conhecidas como mutações *gsp*, são pontuais em heterozigose e determinam a perda da atividade GTPase intrínseca da subunidade α , com a consequente ativação constitutiva da via da adenilato ciclase (20, 83). As manifestações clínicas da síndrome de McCune-Albright são variáveis, em função, sobretudo, da distribuição das mutações somáticas em mosaico nos tecidos afetados. A tríade clássica dessa síndrome é constituída pela presença de displasia fibrosa polióstótica, manchas cutâneas do tipo “café com leite” e puberdade precoce isossexual independente de gonadotrofinas (83). Variações clínicas dessa tríade clássica podem ocorrer, com a presença de outras endocrinopatias e anormalidades não endócrinas. Já foram descritas na síndrome de McCune-Albright a presença de hiperplasia adrenal bilateral e síndrome de Cushing, no entanto, esses achados seriam infrequentes (82, 83). Em 2003, Fragoso *et al.* (84) identificaram duas mutações *gsp* diferentes no códon da arginina 201, em três pacientes com AIMAH, que não apresentavam outras manifestações clínicas típicas da síndrome de McCune-Albright. Posteriormente, Hsiao *et al.* (85) descreveram uma mutação somática no mesmo códon, em uma outra paciente com AIMAH. Esses casos poderiam representar variantes da síndrome de McCune-Albright ou mutações somáticas tardias, uma vez que mutações *gsp* já foram também descritas fora do contexto dessa síndrome, na acromegalia, nas neoplasias tireoidianas, testiculares e ovarianas (20, 82). Outros trabalhos não identificaram a presença de mutações *gsp* na AIMAH (21). Diferenças na metodologia empregada para a investigação das mutações poderiam justificar a discrepância desses achados.

1.2.4.5 Associação com a neoplasia endócrina múltipla do tipo 1 (NEM1)

A NEM1 é uma síndrome genética complexa causada pela mutação do gene supressor de tumor *multiple endocrine neoplasia type I (MEN1)* (OMIM 613733), localizado no cromossoma 11q13.1. A proteína do gene *MEN1*, denominada menin, interage diretamente com o DNA e com uma série de outras proteínas e fatores de transcrição, desempenhando várias funções: regula direta e indiretamente o ciclo celular, inibindo a proliferação das células; participa da reparação do DNA; interage com o oncogene *JunD*, inibindo sua atividade transcricional e, conseqüentemente, o crescimento celular, entre outras (86). Transmitida de forma autossômica dominante, a NEM1 tem uma expressividade variável com a idade. A associação de hiperparatiroidismo, adenomas adeno-hipofisários e neoplasias das ilhotas pancreáticas é típica dessa síndrome genética. Outras manifestações, no entanto, também podem estar presentes, tais como: lesões adrenocorticais, lipomas, angiofibromas faciais, colagenomas, gastrinomas duodenais, tumores tireoidianos, tumores carcinoides e meningiomas (87, 88). As lesões adrenocorticais são relativamente frequentes na NEM1, em uma casuística o aumento bilateral das adrenais foi documentado em 21% dos casos (5, 89). A fisiopatologia das alterações adrenocorticais na NEM do tipo 1 ainda não é compreendida. Conforme o modelo proposto por Knudson para o desenvolvimento tumoral (*Knudson's two-hit model*), era de se esperar que o outro alelo do *MEN1*, inicialmente não mutado, apresentasse uma inativação somática na adrenal hiperplasiada; no entanto, isso parece não ocorrer. Diferentemente dos demais tumores associados à NEM1, nas lesões adrenocorticais ainda não foi demonstrada a perda da heterozigosidade (LOH) do *MEN1* (87, 90). Além disso, também não foram relatadas mutações germinativas ou

somáticas do *MEN1* na AIMAH, fora do contexto dessa síndrome genética.

1.2.4.6 Associação com a polipose adenomatosa familiar

A polipose adenomatosa familiar é uma condição herdada de forma autossômica dominante, associada à mutação germinativa inativadora do gene supressor de tumor *adenomatous polyposis coli* (*APC*) (OMIM 611731), localizado no cromossomo 5q22.2 (91). A proteína APC possui múltiplos domínios por meio dos quais ela interage com uma série de outras proteínas, entre elas, a β -catenina, a axina e os microtúbulos. Por intermédio dessas interações, o APC desempenha diversos papéis: inibe a via de sinalização Wnt canônica, controlando a proliferação e diferenciação celular; controla a adesão e migração celular; estabiliza a segregação dos cromossomos, entre outros (92). A inativação bialélica do APC resulta na ativação constitutiva da β -catenina e, consequentemente, da via de sinalização Wnt canônica, predispondo à tumorigênese (93). A polipose adenomatosa familiar caracteriza-se pela presença de inúmeros pólipos adenomatosos no cólon e no reto, a partir da segunda e terceira décadas de vida. Com a progressão da doença, ocorre o desenvolvimento de carcinomas colorretais, cuja incidência é de quase 100% a partir dos 40 anos, na ausência de tratamento adequado (94, 95). Algumas manifestações extraintestinais ocorrem com maior frequência nos indivíduos com polipose adenomatosa familiar, tais como: o carcinoma papilífero da tireoide, o hepatoblastoma, os tumores cerebrais, o carcinoma pancreático, as lesões adrenocorticais, o tumor desmoide, o osteoma, o cisto epidermoide, os fibromas, os lipomas e a hipertrofia congênita do epitélio pigmentar da retina (95). As lesões adrenocorticais (adenomas, carcinomas e AIMAH) são de duas a quatro vezes mais

frequentes nos pacientes portadores de polipose adenomatosa familiar (93, 95). Nessas lesões, geralmente observa-se a inativação bialélica do *APC*, ou seja, a presença da mutação germinativa e somática no tecido adrenal, em conformidade com o modelo proposto por Knudson (93, 94, 96, 97). Em somente um paciente com AIMAH e polipose adenomatosa familiar, não foi observada a perda da heterozigosidade (LOH) do *APC* na adrenal hiperplasiada (98). Já foi demonstrado, inclusive em modelos animais, que a via de sinalização Wnt canônica está relacionada à tumorigênese adrenal. Especula-se que essa mesma via de sinalização possa estar relacionada à fisiopatologia da AIMAH (93). Até o momento, as mutações germinativas e somáticas do gene *APC* somente foram descritas na AIMAH no contexto da polipose adenomatosa familiar (85).

1.2.4.7 Associação com a leiomiomatose hereditária e carcinoma de células renais

A leiomiomatose hereditária e carcinoma de células renais (HLRCC - hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer) é uma síndrome genética autossômica dominante, causada pela mutação inativadora do gene supressor de tumor *fumarate hydratase (FH)* (OMIM 136850), localizado no cromossoma 1q43 (99). Esse gene codifica a enzima fumarato hidratase que converte o fumarato em malato no ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs). Com a mutação do *FH*, ocorre o acúmulo do fumarato no interior da mitocôndria. Esse substrato em excesso extravasa para o citoplasma da célula, inibindo um grupo de enzimas denominadas prolil-hidroxilases (PHDs). A inibição dessas enzimas determina a ativação de um fator de transcrição, denominado fator 1 induzido por hipóxia (HIF1), favorecendo o

aumento da atividade glicolítica, a neovascularização e a inibição da apoptose celular, importantes para a tumorigênese (100, 101). A HLRCC caracteriza-se pela associação de leiomiomas cutâneos, leiomiomas ou leiomiossarcomas uterinos e carcinoma renal papilífero (102). Nos tumores associados a essa síndrome genética, em geral, observa-se a inativação bialélica do gene *FH*, com a perda do alelo normal. Só recentemente, foi documentada a presença de lesões adrenais bilaterais em alguns casos isolados de HLRCC (102, 103). Em uma das pacientes avaliadas, foi inclusive comprovada a perda da heterozigosidade (LOH) do gene *FH* na adrenal hiperplasiada (102). Até o momento, os únicos relatos de mutação do gene *FH* na AIMAH ocorreram dentro do contexto dessa síndrome genética (85).

1.2.4.8 Vias de sinalização e alterações genéticas potencialmente relacionadas à AIMAH

Alguns estudos analisaram a expressão gênica na AIMAH, com o intuito de investigar quais seriam as vias de sinalização e os mediadores moleculares potencialmente relacionados à doença.

Em 2004, Bourdeau *et al.* (104) avaliaram o perfil da expressão gênica na AIMAH em um experimento de *microarray* de DNA complementar (cDNA *microarray*). Nesse estudo, foram utilizadas amostras de tecido adrenal de oito pacientes diferentes com a doença. Foi proposto que a ativação da via de sinalização dos fatores de transcrição induzidos por hipóxia (HIFs) poderia estar relacionada à fisiopatologia da AIMAH. Foi sugerido também que nos pacientes com AIMAH e expressão aberrante do receptor do GIP, a via de sinalização Wnt poderia estar ativada. Conforme comentado anteriormente, outros trabalhos demonstraram que

essas duas vias de sinalização estão hiperativadas, respectivamente, na leiomiomatose hereditária e carcinoma de células renais (HLRCC) e na polipose adenomatosa familiar, síndromes genéticas já relacionadas à AIMAH (92, 99). Ainda segundo Bourdeau *et al.*, outra via de sinalização possivelmente ativada na AIMAH seria a da proteína cinase A (PKA), já sendo conhecida a relação entre a hiperativação dessa via e a doença adrenocortical nodular pigmentada primária (PPNAD) (105). Além disso, demonstrou-se que os genes de algumas enzimas esteroidogênicas encontravam-se hipoexpressos, fortalecendo-se a hipótese da ineficiência da esteroidogênese na AIMAH (20).

Em uma outra casuística composta por oito pacientes com AIMAH e expressão aberrante do receptor do GIP, Antonini *et al.* (76) avaliaram a expressão de uma série de genes relacionados à esteroidogênese e à via de sinalização da PKA. Semelhantemente ao trabalho anterior, demonstrou-se, nesse estudo, uma hipoexpressão dos genes relacionados à esteroidogênese; no entanto, a via de sinalização da PKA também aparentava estar hipoativada, divergindo do trabalho de Bourdeau *et al.* (104).

Lampron *et al.* (106) conduziram um estudo de expressão gênica em escala genômica (*whole genome expression profiling*), envolvendo cinco pacientes com AIMAH e expressão aberrante do receptor do GIP e outros cinco pacientes com hiperplasia adrenal dependente de ACTH. O material genético para o estudo foi extraído diretamente das adrenais hiperplasiadas. Entre os pacientes com AIMAH, foi novamente demonstrada uma hipoexpressão dos genes relacionados à esteroidogênese. Observou-se também a hiperexpressão gênica anormal de diversos receptores transmembrana acoplados à proteína G (GPCR), muitos ainda não

descritos na AIMAH. Apesar da demonstração nesse estudo de inúmeros outros genes hipo e hiperexpressos, não foi possível propor de forma convincente quais seriam as principais vias de sinalização potencialmente relacionadas à AIMAH.

Em 2006, Bourdeau *et al.* (107) conduziram um outro estudo, com o intuito de avaliar, especificamente, se a via de sinalização da PKA estaria alterada na AIMAH. Foi demonstrado que a atividade da PKA nas adrenais hiperplasiadas estava aumentada em relação às adrenais normais. No entanto, não foi encontrada nenhuma mutação no gene da subunidade reguladora tipo 1A da PKA (*PRKAR1A*), a qual é frequentemente descrita na PPNAD e no complexo de Carney (108). Foi proposto, então, que uma expressão alterada das subunidades reguladoras da PKA determinaria a maior atividade dessa última.

Em um grupo de 18 pacientes com AIMAH, Assie *et al.* (109) avaliaram, por cDNA *microarray*, a expressão gênica de mais de 800 receptores transmembrana acoplados à proteína G (GPCR). Demonstrou-se nas adrenais hiperplasiadas a expressão de vários receptores transmembrana ainda não descritos na AIMAH. Além disso, glândulas diferentes expressavam com frequência receptores distintos. Dessa forma, era difícil atribuir a hiperplasia à presença de um receptor hormonal específico. Nesse mesmo estudo, demonstrou-se ainda que as glândulas adrenais cronicamente estimuladas pelo ACTH, provenientes de pacientes com doença de Cushing, não infrequentemente, também expressavam GPCR. Esse último achado, de certa forma, favorece a hipótese de que a expressão dos receptores aberrantes na AIMAH possa ser um epifenômeno do processo fisiopatológico.

MicroRNAs (miRNAs) são moléculas de RNA de cerca de 22 nucleotídeos, não codificadoras de proteínas e que atuam como potentes reguladoras pós-

transcricionais da expressão gênica, tanto em contextos fisiológicos como nas doenças. Os miRNAs ligam-se a regiões específicas do RNA mensageiro (mRNA) promovendo sua degradação e/ou inibindo a tradução de proteínas (110, 111). Bimpaki *et al.* (112) realizaram um estudo de *microarray* de miRNA (miRNA *microarray*) em 10 pacientes com AIMAH, tendo como objetivo definir o perfil de miRNAs na doença. Nas adrenais hiperplasiadas, foram encontrados 37 miRNAs com expressão alterada (hipo ou hiperexpressos). Dois deles chamaram a atenção, em função do papel que desempenham. O miRNA mir-210, cuja expressão estava aumentada, tem sua transcrição estimulada pela via de sinalização dos fatores de transcrição induzidos por hipóxia (HIFs). O miRNA mir-200b, cuja expressão estava reduzida na AIMAH, é um regulador da tradução da proteína *matrin 3*. Localizada na matriz nuclear, essa proteína é um substrato da PKA.

Em um outro estudo, Almeida *et al.* (113) avaliaram de forma pormenorizada diferentes nódulos adrenais de um mesmo paciente com AIMAH. Em cada nódulo, realizou-se um estudo de expressão gênica em escala genômica (*whole genome expression profiling*) e a pesquisa de desarranjos cromossômicos por hibridização genômica comparativa em *array* (*oligonucleotide array comparative genomic hybridization*). Observou-se que o ganho de regiões cromossômicas era mais frequente nos nódulos adrenais maiores e que metade dos genes hiperexpressos estavam localizados nessas regiões amplificadas do genoma. O padrão de expressão de alguns genes também sugeria a ativação da via de sinalização Wnt, em conformidade com os achados de Bourdeau *et al.* (104). Trabalhos recentes têm comprovado a participação dessa via de sinalização no desenvolvimento da glândula adrenal, em sua hiperplasia e tumorigênese (93, 114). Almeida *et al.* (113)

observaram ainda que, apesar dos genes das subunidades catalíticas da PKA estarem hiperexpressos, a atividade dessa enzima tendia a ser menor nos nódulos maiores, em relação àqueles de tamanho menor. Além disso, os autores sugerem que o incremento do tamanho dos nódulos adrenais estaria relacionado ao acúmulo progressivo de alterações cromossômicas e à ativação de vias de sinalização geralmente relacionadas à carcinogênese.

Gagliardi *et al.* (115) conduziram um estudo para avaliar o perfil da expressão gênica (*whole genome expression profiling*) na AIMAH familiar. Transcriptomas obtidos das adrenais de três irmãos foram comparados com dois outros provenientes de glândulas normais. Nesse trabalho, diferentemente dos anteriores, não foi encontrada uma hipoexpressão gênica significativa das enzimas esteroidogênicas. Inicialmente, foi observado que os três irmãos apresentavam um incremento do cortisol, após o estímulo *in vivo* com a vasopressina e que os genes dos receptores da arginina vasopressina estavam hiperexpressos nas glândulas hiperplasiadas. No entanto, durante o estudo, não foi possível identificar os mecanismos relacionados à expressão aberrante desses receptores. Diferentemente do esperado, as vias de sinalização dos receptores da arginina vasopressina não se encontravam hiperativadas. Por fim, demonstrou-se nesse estudo que alguns dos genes diferentemente expressos na AIMAH familiar já haviam sido anteriormente relacionados à tumorigênese. Desta forma, foi sugerido que a AIMAH e os tumores adrenocorticais malignos compartilhariam algumas vias de sinalização, em conformidade ao que fora anteriormente proposto por Almeida *et al.* (113).

1.2.5 Tratamento

A adrenalectomia bilateral tem sido o tratamento mais utilizado na AIMAH associada à síndrome de Cushing manifesta (7). Alguns autores têm proposto a adrenalectomia unilateral da maior glândula hiperplasiada, como uma forma de tratamento seguro e alternativo, sobretudo quando as manifestações clínicas da síndrome de Cushing são mais modestas (116-118). No entanto, a possibilidade da persistência de um quadro de hipercortisolismo subclínico, com consequente morbidade, sobretudo a longo prazo, suscita dúvidas sobre o real benefício de tal conduta (118-120). A ressecção preferencial da adrenal que apresenta à cintilografia uma maior captação de iodo-131-6 β -iodometil-19-norcolesterol, ou mesmo, a adrenalectomia total de um lado, associada à ressecção parcial da adrenal contralateral são outras técnicas cirúrgicas anteriormente propostas e que precisam ser melhor avaliadas (118, 121). Naqueles pacientes com AIMAH e Cushing subclínico, não há um consenso em relação à necessidade de uma terapêutica específica. Nesses casos, a presença de manifestações potencialmente relacionadas ao excesso de cortisol, tais como o diabetes melito (DM) e a dislipidemia, entre outras, devem ser levadas em consideração para a indicação do tratamento (7).

A identificação de receptores hormonais aberrantes na AIMAH motivou a utilização anterior de antagonistas específicos, com o objetivo de se controlar a síntese de cortisol (58, 60, 65, 67, 68, 118, 122). No entanto, são raros os relatos de sucesso dessa forma de tratamento no controle do hipercortisolismo a médio e longo prazo (68, 122).

O tratamento com cetoconazol (70), metirapona (120, 123), mitotano (124) ou trilostano (125), visando o controle do hipercortisolismo relacionado à AIMAH,

tem mostrado resultados promissores, apesar da escassez de relatos na literatura. Como a esteroidogênese na AIMAH não é um processo eficaz, é esperado que se consiga um controle do hipercortisolismo com doses mais baixas desses medicamentos, algo que precisa ser confirmado.

2 Objetivos

Fundamentado, sobretudo, no estudo de uma grande família com AIMAH, este trabalho teve como objetivos:

- I. Caracterizar a evolução da AIMAH familiar, correlacionando as manifestações clínicas, os dados laboratoriais e os achados radiológicos.
- II. Investigar quais eram os receptores hormonais aberrantes presentes nos membros da família diagnosticados com a doença.
- III. Investigar a possível associação entre a AIMAH e a ocorrência de meningiomas intracranianos.
- IV. Caracterizar o padrão de captação da ^{18}F -FDG na AIMAH, no exame de PET/CT.
- V. Definir o padrão de herança genética da doença na família.
- VI. Mapear regiões cromossômicas e loci potencialmente relacionados à etiologia genética da AIMAH familiar.

3 Métodos

3.1 Considerações éticas

Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos, seguindo as orientações contidas na declaração de Helsinki. Consentimento por escrito foi obtido de todos os pacientes ou pais/tutores, antes que os procedimentos de pesquisa fossem iniciados. O estudo foi submetido à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), tendo sido aprovado (Protocolo de Pesquisa CAPPesq n° 0452/10).

3.2 Casuística

No estudo, foram avaliados 96 indivíduos pertencentes a uma grande genealogia com AIMAH familiar. O caso-índice foi diagnosticado com a doença em 2003, no HCFMUSP, durante propedêutica para a investigação de hipertensão arterial secundária. Dois anos depois, um outro membro da família, irmão do caso-índice, também foi diagnosticado com AIMAH, após propedêutica radiológica para a investigação de um episódio de sangramento anal (diagnóstico incidental). Por se tratar da forma familiar (herdada) da AIMAH, foi realizada, a partir de 2009, a avaliação sistemática dos demais membros da família, em busca de outros casos da doença.

Como a AIMAH torna-se clinicamente manifesta, sobretudo, entre a quinta e sexta décadas de vida (20-22), no início do estudo, avaliou-se prioritariamente os parentes de primeiro e segundo graus do caso-índice, com idade superior a 40 anos. Após se diagnosticar um indivíduo com AIMAH, foi realizada também a avaliação de seus descendentes diretos, independentemente da idade dos mesmos (Figura 3).

Figura 3. Heredograma da família com AIMAH, contendo os indivíduos inicialmente avaliados.

Figura 4. Heredograma da família com AIMAH, contendo os indivíduos avaliados ao final do estudo.

Diante da confirmação de novos casos da doença na família, conduziu-se, posteriormente, uma investigação mais abrangente. Foram incluídos no estudo indivíduos mais jovens e parentes mais distantes do caso-índice (Figura 4).

Todos os integrantes da família foram avaliados pelo mesmo examinador. Foi necessário percorrer mais de 25 mil quilômetros, em cinco estados brasileiros, ao longo de 18 meses de investigação, até que a casuística estivesse completa.

3.3 Estudo clínico

Nesta primeira etapa do trabalho, realizou-se uma avaliação sistemática dos membros da genealogia, com o intuito de caracterizar melhor as peculiaridades da doença em sua forma familiar. Foram conduzidas a avaliação clínica, laboratorial e radiológica dos participantes, conforme será explicitado a seguir. Os indivíduos com o diagnóstico confirmado de AIMAH foram convocados a comparecer ao HCFMUSP, para a complementação da propedêutica e realização dos testes para a pesquisa de receptores hormonais aberrantes. Foram disponibilizados aos indivíduos com AIMAH acompanhamento médico e tratamento gratuitos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), no HCFMUSP.

3.3.1 Avaliação clínica dos pacientes

Os pacientes foram inicialmente esclarecidos sobre a natureza do estudo e após preencherem o Termo de Consentimento, foram submetidos a uma anamnese e exame físico minuciosos, conforme o protocolo a seguir (Figura 5).

DADOS PESSOAIS:			
DATA: ____/____/____	CIDADE: _____	CÓDIGO DO PACIENTE: _____	
NOME: _____			
ENDEREÇO: _____		TELEFONE: ( ) _____	
_____		CELULAR: ( ) _____	
IDADE: _____	DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____	SEXO: F ☐ M ☐	COR: _____
ACHADOS CLÍNICOS:			
PESO: _____ Kg	ESTATURA: _____ m	IMC: _____ Kg/m ²	PA: _____ mmHg FC: _____
CIRC. CERVICAL: _____ cm	CIRC. CINTURA: _____ cm	CIRC. QUADRIL: _____ cm	
GANHO PONDERAL ☐	HIRSUTISMO ☐	IRREGULARIDADE MENSTRUAL: OLIGOMENORREIA ☐	AMENORREIA ☐
_____ kg em _____	FERRIMAN _____	MENARCA _____	MENOPAUSA _____
FACE LUA CHEIA ☐	PLETORA ☐	GIBA ☐	FOSSAS SUPRACLAVICULARES PREENCHIDAS ☐
EQUIMOSE ☐	ACNE ☐	FRAQUEZA PROXIMAL ☐	DIFICULDADE DE CICATRIZAÇÃO ☐
EDEMA ☐	FRATURAS ☐	SINTOMAS DEPRESSIVOS ☐	LABILIDADE EMOCIONAL ☐
ESTRIAS VIOLÁCEAS ☐	CEFALEIA ☐	OBESIDADE CENTRÍPETA ☐	REDUÇÃO DA LIBIDO ☐
INFECÇÃO CUTÂNEA ☐	IMPOTÊNCIA ☐	HISTÓRIA DE MICOSE ☐	PELE ATRÓFICA ☐
COMORBIDADES:			
HAS ☐	DM ou PRÉ-DIABETES ☐	DISLIPIDEMIA ☐	
Início: _____	Início: _____	Início: _____	
OUTROS COMORBIDADES: _____			
_____			
TEMPO DO INÍCIO DOS PRIMEIROS ACHADOS ATÉ O DIAGNÓSTICO: _____			
MEDICAMENTOS EM USO (INCLUSIVE ANTICONCEPCIONAIS): _____			
_____			
EXAME FÍSICO GERAL: _____			
_____			
OUTROS DADOS RELEVANTES: _____			
_____			

Figura 5. Protocolo utilizado na anamnese e no exame físico dos indivíduos pertencentes à genealogia com AIMAH familiar. Em linhas gerais, foram avaliados sinais, sintomas e comorbidades frequentemente associados à síndrome de Cushing, os dados antropométricos dos indivíduos e as medicações em uso. Feminino (F) masculino (M); índice de massa corporal (IMC); pressão arterial (PA); frequência cardíaca (FC); circunferência cervical (circ. cervical); circunferência da cintura (circ. cintura); circunferência do quadril (circ. quadril); hipertensão arterial sistêmica (HAS); diabetes melito (DM).

3.3.2 Avaliação laboratorial inicial

Durante a investigação inicial da síndrome de Cushing, foram realizados dois exames laboratoriais, a dosagem do cortisol salivar à meia-noite e o teste de supressão com 1 mg de dexametasona via oral (VO) à meia-noite (TSDexa). No primeiro exame, foi colhida uma amostra da saliva do paciente à meia-noite. Um valor do cortisol salivar maior que 0,13 mcg/dL foi considerado compatível com a alteração do ritmo circadiano normal do cortisol, alteração esta presente na síndrome de Cushing (2, 126). No segundo exame laboratorial, cada indivíduo ingeriu dois comprimidos de 0,5 mg de dexametasona (*Decadron, Aché Laboratórios Farmacêuticos SA, Guarulhos, Brasil*) à meia-noite, realizando-se a coleta de sangue para a dosagem do cortisol, entre às 7 e 8 horas da manhã seguinte. Um valor do cortisol sérico maior ou igual a 1,8 mcg/dL foi considerado um indicativo da perda da supressividade do cortisol à dexametasona, alteração presente na síndrome de Cushing (2). O cortisol salivar foi dosado pelo método de radioimunoensaio (*Coat-A-Count, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Los Angeles, CA, EUA*; coeficiente de variação (CV) intraensaio = 10,9%; CV interensaio = 11,5%; sensibilidade analítica (SA) = 0,1 mcg/dL) e o cortisol sérico pelo método de quimioimunoensaio (*Immulite 2000, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Llanberis, Gwynedd, Reino Unido*; CV intraensaio = 6,0%; CV interensaio = 7,8%; SA = 0,2 mcg/dL). Diante de pelo menos um exame alterado, ambos foram repetidos após a coleta de novas amostras de saliva e sangue, objetivando-se confirmar os resultados. Desta vez, foi avaliada também a concentração sérica da dexametasona, entre às 7 e 8 horas da manhã, por cromatografia líquida e espectrometria de massa em tandem (*Quest Diagnostics Nichols Institute, San Juan Capistrano, CA, EUA*). Visava-se verificar se a

concentração da medicação estava adequada (valor de referência (VR) = 180-550 ng/dL) durante o TSDexa. Os resultados dos exames laboratoriais foram interpretados levando-se em consideração o contexto clínico do paciente e os resultados dos exames de imagem. Com o intuito de se investigar a presença de situações clínicas que poderiam levar à interpretação equivocada dos exames supracitados, foram realizadas também as seguintes dosagens séricas: alanina aminotransferase (método cinético automatizado) e aspartato aminotransferase (método cinético automatizado), para a investigação de hepatopatias; e creatinina (método colorimétrico cinético) e ureia (método cinético automatizado), para a investigação de nefropatias. Pacientes com insuficiência renal ou hepática podem apresentar uma redução do *clearance* da dexametasona, com consequente resultado falso-negativo no TSDexa; o inverso pode ocorrer em outras hepatopatias, como a alcoólica, nas quais o *clearance* da dexametasona está aumentado (2, 3, 127). Por fim, foi investigada a presença de dislipidemia, sendo realizadas as dosagens de colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e triglicérides, todas pelo método enzimático colorimétrico automatizado.

Todas as amostras laboratoriais obtidas em campo foram coletadas, centrifugadas (quando indicado), refrigeradas e transportadas, conforme preconizado. Para a coleta dos exames, foi solicitado pelo menos 48 horas de abstinência etílica. A saliva foi coletada em recipientes apropriados (*Salivette*, *Sarstedt*, Nümbrecht, Alemanha), após um período de 4 horas de jejum e sem escovar os dentes, sendo mantida a uma temperatura de 2-8 °C, até a análise. As amostras de sangue para a dosagem do cortisol sérico e dos exames bioquímicos foram colhidas após 12 horas

de jejum, em tubos secos a vácuo com gel separador (*Vacurette, Greiner Bio-One Brasil Produtos Médicos Hospitalares Ltda., Americana, Brasil*). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rotações por minuto (RPM), por 15 minutos, com a posterior separação e acondicionamento do soro a uma temperatura de 2-8 °C, até a análise. As amostras de sangue para a dosagem da dexametasona sérica foram colhidas em tubos secos a vácuo sem aditivos (*Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA*), centrifugadas a 3.000 RPM, por 15 minutos, com a posterior separação e refrigeração do soro a uma temperatura de 2-8 °C, até a análise. Todas as dosagens hormonais e bioquímicas desta etapa foram realizadas no HCFMUSP (Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 e Laboratório Central), exceto a dosagem da dexametasona sérica, que foi feita no *Quest Diagnostics Nichols Institute*, nos EUA.

3.3.3 Avaliação radiológica inicial

Os parentes de primeiro e segundo graus dos dois pacientes inicialmente diagnosticados com AIMAH (o caso índice e seu irmão), todos os indivíduos com idade superior a 60 anos (independente do grau de parentesco) e todos os indivíduos com *screening* laboratorial positivo para síndrome de Cushing foram submetidos a uma tomografia computadorizada (TC) sem contraste das adrenais, visando caracterizar o tamanho e a morfologia das glândulas. Os critérios de seleção para a realização dos exames de imagem foram estabelecidos com o intuito de priorizar aqueles pacientes com maior propensão a apresentar a doença, diante, sobretudo, da dificuldade logística de se realizar um exame de TC em todos os pacientes avaliados. Desta forma, em conformidade com os critérios supracitados, 57 membros da família

realizaram uma exame de TC das adrenais. Objetivando-se garantir a uniformidade e qualidade das tomografias, foram definidas as seguintes especificações técnicas, essenciais para a realização dos exames: disponibilidade de tomógrafo *multislice* com pelo menos seis detectores, espessura do corte axial sobre as glândulas adrenais de até 3 mm e liberação dos resultados dos exames em CD ou DVD no formato DICOM (*digital imaging and communications in medicine*). Foi também solicitada, quando possível, a reconstrução das imagens das adrenais no plano coronal. Foram selecionados centros de radiologia capacitados para a realização das tomografias, dentro dos critérios estabelecidos, em sete cidades-polo: Belo Horizonte, Uberlândia, Patos de Minas, Brasília, Cuiabá, São Paulo e Rio de Janeiro. Para a realização das TCs, foi necessário, com frequência, o deslocamento dos indivíduos até uma das cidades citadas. Todo o custo com o transporte e exames de imagem foi pago com recursos financeiros da pesquisa.

Os exames foram revisados, de forma independente, por dois médicos radiologistas do Instituto de Radiologia do HCFMUSP. Estes desconheciam os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes. As dimensões das adrenais foram avaliadas no plano axial, sendo traçadas linhas retas para medir a maior espessura (largura) do corpo da glândula e de suas asas medial e lateral (Figura 6) (128, 129).

Figura 6. Dimensões da glândula adrenal avaliadas no plano axial. Maior largura do corpo da glândula (1) e de suas asas (2).

Adaptado de Sohaib *et al.* (128).

As dimensões das adrenais, consideradas normais no plano axial, estão dispostas na tabela a seguir (Tabela 3) (130).

Tabela 3. Dimensões usuais das adrenais normais.

Glândula adrenal	Largura do corpo	Largura das asas mediais	Largura das asas laterais
Direita	3,0-12,3 mm	1,4-4,9 mm	1,4-4,9 mm
Esquerda	4,1-12,3 mm	1,7-5,1 mm	1,3-5,2 mm

Adaptado de Vincent *et al.* (130).

No estudo, a glândula foi considerada espessada quando pelo menos duas de suas medidas estavam aumentadas (Tabela 4). Foram também avaliados nas TCs o número de nódulos em cada glândula adrenal, além do tamanho e densidade dos maiores nódulos.

Tabela 4. Critérios utilizados para caracterizar o aumento das adrenais. No estudo, a glândula foi definida como espessada diante da presença de duas ou mais medidas alteradas.

Glândula adrenal	Largura do corpo	Largura das asas mediais	Largura das asas laterais
Direita	> 12 mm	> 5,0 mm	> 5,0 mm
Esquerda	> 12 mm	> 5,0 mm	> 5,0 mm

3.3.4 Complementação da propedêutica laboratorial

O diagnóstico da AIMAH foi estabelecido diante da confirmação da perda da supressividade do cortisol no TSDexa e/ou da elevação do cortisol salivar à meia-noite, em um paciente com alterações radiológicas compatíveis com a doença (presença de um ou mais nódulos adrenais > 1 cm e/ou espessamento de uma ou ambas as glândulas). Uma vez confirmado o diagnóstico da AIMAH, a propedêutica laboratorial foi complementada, mediante a realização dos seguintes exames: cortisol total em urina de 24 horas (quimioimunoensaio sem extração prévia, *Immulite 2000*,

Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Llanberis, Gwynedd, Reino Unido; VR = 50-310 mcg/24h; CV intraensaio = 5,3%; CV interensaio = 7,5%; SA = 0,2 mcg/dL) ou cortisol livre em urina de 24 horas (quimioluminescência com extração prévia, *Unicel DxI 800, Beckman Coulter*, Fullerton, CA, EUA; VR = 21-111 mcg/24h; CV intraensaio = 6,7%; CV interensaio = 7,9%; SA = 0,4 mcg/dL); sulfato de desidroepiandrosterona sérico (ensaio eletroquimioluminométrico, *Cobas, Roche Diagnostics GmbH*, Mannheim, Alemanha; VR diferente, conforme idade e sexo; CV intraensaio = 2,4%; CV interensaio = 3,3%; SA = 1,0 ng/mL); androstenediona sérica (químioimunoensaio, *Immulite 2000, Siemens Healthcare Diagnostics Inc.*, Llanberis, Gwynedd, Reino Unido; VR diferente, conforme idade e sexo; CV intraensaio = 9,9%; CV interensaio = 11,9%; SA = 0,3 ng/mL); testosterona total sérica (fluoroimunoensaio, *AutoDelfia, PerkinElmer*, Turku, Finlândia; VR diferente, conforme idade e sexo; CV intraensaio = 3,0%; CV interensaio = 6,4%; SA = 11 ng/dL); e ACTH plasmático (ensaio imunoquimioluminométrico, *Immulite 2000, Siemens Healthcare Diagnostics Inc.*, Llanberis, Gwynedd, Reino Unido; VR até 46 pg/mL; CV intraensaio = 7,7%; CV interensaio = 8,5%; SA = 5 pg/mL) ou imunoensaio eletroquimioluminescente, *Cobas, Roche Diagnostics GmbH*, Mannheim, Alemanha; VR até 63,3 pg/mL; CV intraensaio = 2,0%; CV interensaio = 2,8%; SA = 1,0 pg/mL). Esses exames visavam quantificar de forma indireta a produção do cortisol em um período de 24 horas (cortisol total ou cortisol livre em urina de 24 horas), avaliar a síntese androgênica adrenal (sulfato de desidroepiandrosterona, androstenediona e testosterona total) e investigar o grau de supressão do ACTH, em decorrência da produção autônoma do cortisol. A maioria das dosagens hormonais foi realizada no Laboratório de Hormônios e Genética

Molecular LIM/42 do HCFMUSP. Algumas dosagens de ACTH plasmático e todas as de cortisol livre em urina de 24 horas foram realizadas no Laboratório Hermes Pardini, em Belo Horizonte/MG.

3.3.5 Pesquisa de receptores hormonais aberrantes nas adrenais

Conforme mencionado anteriormente, alguns pesquisadores propõem que a síntese de cortisol e o crescimento das adrenais na AIMAHA estariam associados à presença de receptores hormonais aberrantes no córtex adrenal. Com o intuito de se investigar quais eram os receptores hormonais aberrantes presentes nos membros da família diagnosticados com AIMAHA, foram realizados diferentes testes de estímulo *in vivo*. Basicamente, foi avaliado se os valores séricos do cortisol elevavam-se, após a indução de um estímulo hormonal ou farmacológico específico. O aumento do cortisol era compatível com a hipótese do acoplamento funcional de um receptor hormonal aberrante com a esteroidogênese adrenal.

Alguns preceitos básicos foram exigidos previamente à condução dos testes. Após a confirmação do diagnóstico da AIMAHA, com base nos exames laboratoriais e radiológicos, o paciente foi inicialmente esclarecido sobre os testes. Diante da concordância do mesmo, um Termo de Consentimento Informado foi então preenchido. Os testes somente foram iniciados, diante da presença de valores basais indetectáveis de ACTH plasmático. Pretendia-se evitar que as flutuações do ACTH, durante o protocolo de testes, pudessem levar a interpretações equivocadas dos resultados. Diante de valores não supressos do ACTH, os testes somente foram conduzidos após a administração de 1 mg de dexametasona (*Decadron*, *Aché Laboratórios Farmacêuticos SA*, Guarulhos, Brasil) VO a intervalos de 6 horas. A

medicação foi iniciada 48 horas antes do início dos testes e mantida durante o transcorrer dos mesmos. Idealmente, os valores do ACTH plasmático deveriam permanecer indetectáveis, a despeito dos diferentes estímulos.

Constituíam contraindicações absolutas à realização dos testes: a recusa do paciente; a presença de gestação; o histórico de hipersensibilidade ou reações adversas anteriores a algum secretogogo (hormônio sintético ou fármaco) utilizado durante o teste; e a utilização recente de medicamentos que pudessem interferir na interpretação dos resultados, tais como betabloqueadores adrenérgicos, antagonistas da angiotensina II, inibidores da enzima conversora de angiotensina, espironolactona, cetoconazol, metirapona ou mitotano.

Os testes foram conduzidos na Unidade de Endocrinologia do HCFMUSP, em conformidade com um protocolo previamente estabelecido e padronizado em publicações científicas anteriores (17, 22, 53, 72), sendo necessários quatro dias para sua conclusão (Tabelas 5 a 8):

Tabela 5. Primeiro dia de testes para a pesquisa de receptores hormonais aberrantes. Foram realizados os estímulos com metoclopramida e terlipressina. O símbolo “✓” significa que o hormônio foi colhido naquele tempo específico.

Horário	Tempo (min)	Primeiro dia	F	ACTH	Aldosterona	APR
	-75	Jejum – deitado				
6:45 h	-15	Jejum – deitado	✓	✓	✓	
7:00 h	0	Metoclopramida 10 mg VO	✓	✓	✓	✓
7:30 h	+30	Deitado	✓	✓	✓	
8:00 h	+60	Deitado	✓	✓	✓	
8:30 h	+90	Deitado	✓	✓	✓	
9:00 h	+120	Deitado	✓	✓	✓	✓
9:30 h	+150	Deitado	✓	✓		
10:00 h	+180	Terlipressina 0,5 mg EV	✓	✓		
10:30 h	+210	Deitado	✓	✓		
11:00 h	+240	Deitado	✓	✓		
11:30 h	+270	Deitado	✓	✓		
12:00 h	+300	Deitado	✓	✓		

Metoclopramida (*Plasil*, Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda., Suzano, Brasil); terlipressina (*Glypressin*, Ferring Arzneimittel GmbH, Kiel, Alemanha); cortisol (F) dosado por quimioimunoensaio (*Immulite 2000*, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Llanberis, Gwynedd, Reino Unido; VR basal = 5-25 mcg/dL; CV intraensaio = 6,0%; CV interensaio = 7,8%; SA = 0,2 mcg/dL); hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) dosado por ensaio imunoquimioluminométrico (*Immulite 2000*, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Llanberis, Gwynedd, Reino Unido; VR basal até 46 pg/mL; CV intraensaio = 7,7%; CV interensaio = 8,5%; SA = 5 pg/mL); aldosterona dosada por radioimunoensaio (*Coat-A-Count*, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Los Angeles, CA, EUA; VR deitado = 1-16 ng/dL; CV intraensaio = 3,3%; CV interensaio = 8,4%; SA = 1,1 ng/dL); atividade plasmática de renina (APR) dosada por radioimunoensaio (*GammaCoat*, DiaSorin Inc., Stillwater MN, EUA; VR em repouso = 0,2-2,8 ng/mL/h; CV intraensaio = 8,0%; CV interensaio = 6,7%; SA = 0,1 ng/mL/h); horas (h); minutos (min); via oral (VO); endovenoso (EV).

Tabela 6. Segundo dia de testes para a pesquisa de receptores hormonais aberrantes. Foram realizados os estímulos com LHRH, TRH e refeição mista. O símbolo “✓” significa que o hormônio foi colhido naquele tempo específico.

Horário	Tempo (min)	Segundo dia	F	ACTH	FSH	LH	TSH	Prolactina
	-75	Jejum – deitado						
6:45 h	-15	Jejum – deitado	✓	✓	✓	✓		
7:00 h	0	LHRH 100 mcg EV	✓	✓	✓	✓		
7:30 h	+30	Deitado	✓	✓	✓	✓		
8:00 h	+60	Deitado	✓	✓	✓	✓		
8:30 h	+90	Deitado	✓	✓	✓	✓		
9:00 h	+120	Deitado	✓	✓	✓	✓		
9:30 h	+150	Deitado	✓	✓			✓	✓
10:00 h	+180	TRH 200 mcg EV	✓	✓			✓	✓
10:30 h	+210	Deitado	✓	✓			✓	✓
11:00 h	+240	Deitado	✓	✓			✓	✓
11:30 h	+270	Deitado	✓	✓			✓	✓
12:00 h	+300	Deitado	✓	✓			✓	✓
12:30 h	+330	Deitado	✓	✓				
13:00 h	+360	Refeição mista	✓	✓				
13:30 h	+390	Deitado	✓	✓				
14:00 h	+420	Deitado	✓	✓				
14:30 h	+450	Deitado	✓	✓				
15:00 h	+480	Deitado	✓	✓				

Gonadorrelina (LHRH) (*Relefact, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH*, Frankfurt, Alemanha); hormônio liberador de tirotrofina (TRH) (*TRH Ferring, Ferring Arzneimittel GmbH*, Kiel, Alemanha); cortisol (F) dosado por quimioimunoensaio (mesmo *kit* citado na Tabela 5); hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) dosado por ensaio imunoquimioluminométrico (mesmo *kit* citado na Tabela 5); hormônio foliculo estimulante (FSH) dosado por ensaio imunofluorimétrico (*AutoDelfia hFSH, PerkinElmer Inc.*, Turku, Finlândia; VR diferente, conforme idade e sexo; CV intraensaio = 1,3%; CV interensaio = 2,6%; SA = 0,05 U/L); hormônio luteinizante (LH) dosado por ensaio imunofluorimétrico (*AutoDelfia hLH Spec, PerkinElmer Inc.*, Turku, Finlândia; VR diferente, conforme idade e sexo; CV intraensaio = 4,3%; CV interensaio = 2,9%; SA = 0,05 U/L); hormônio tirotrófico (TSH) dosado por ensaio imunofluorimétrico (*AutoDelfia hTSH Ultra, PerkinElmer Inc.*, Turku, Finlândia; VR diferente, conforme idade; CV intraensaio = 2,9%; CV interensaio = 2,9%; SA = 0,005 mcU/mL); prolactina dosada por ensaio imunofluorimétrico (*AutoDelfia Prolactin, PerkinElmer Inc.*, Turku, Finlândia; VR diferente, conforme sexo; CV intraensaio = 1,1%; CV interensaio = 2,6%; SA = 0,04 ng/mL); minutos (min); via oral (VO); endovenoso (EV).

Tabela 7. Terceiro dia de testes para a pesquisa de receptores hormonais aberrantes. Foram realizados os estímulos com glucagon e o teste postural. O símbolo “✓” significa que o hormônio foi colhido naquele tempo específico.

Horário	Tempo (min)	Terceiro dia	F	ACTH	Aldosterona	APR
	-75	Jejum - deitado				
6:45 h	-15	Jejum - deitado	✓	✓		
7:00 h	0	Glucagon 1 mg EV	✓	✓		
7:30 h	+30	Deitado	✓	✓		
8:00 h	+60	Deitado	✓	✓		
8:30 h	+90	Deitado	✓	✓		
9:00 h	+120	Deitado	✓	✓		
9:30 h	+150	Deitado	✓	✓	✓	
10:00 h	+180	Teste postural	✓	✓	✓	✓
10:30 h	+210	Deambulação	✓	✓	✓	
11:00 h	+240	Deambulação	✓	✓	✓	
11:30 h	+270	Deambulação	✓	✓	✓	
12:00 h	+300	Deambulação	✓	✓	✓	✓

Glucagon (*GlucaGen*, Novo Nordisk SA, Bagsvaerd, Dinamarca); cortisol (F) dosado por quimioimunoensaio (mesmo *kit* citado na Tabela 5); hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) dosado por ensaio imunoquimioluminométrico (mesmo *kit* citado na Tabela 5); Aldosterona dosada por radioimunoensaio (mesmo *kit* citado na Tabela 5); atividade plasmática de renina (APR) dosada por radioimunoensaio (mesmo *kit* citado na Tabela 5); horas (h); minutos (min); endovenoso (EV).

Tabela 8. Quarto dia de testes para a pesquisa de receptores hormonais aberrantes. Foi realizado o estímulo com ACTH sintético. O símbolo “✓” significa que o hormônio foi colhido naquele tempo específico.

Horário	Tempo (min)	Quarto dia	F
	-75	Jejum - deitado	
6:45 h	-15	Jejum - deitado	✓
7:00 h	0	ACTH 250 mcg EV	✓
7:30 h	+30	Deitado	✓
8:00 h	+60	Deitado	✓
8:30 h	+90	Deitado	✓
9:00 h	+120	Deitado	✓

Tetracosactida (ACTH sintético) (*Synacthen*, Novartis Pharma AG, Basel, Suíça); cortisol (F) dosado por quimioimunoensaio (mesmo *kit* citado na Tabela 5); horas (h); minutos (min); endovenoso (EV).

No primeiro dia de testes, a ingestão oral da metoclopramida avaliou a participação dos receptores da serotonina 5-HT₄ e 5-HT₇ no estímulo à esteroidogênese. Durante esse teste, foram dosadas também a aldosterona e a atividade plasmática de renina (APR), com o objetivo de se comprovar a efetividade do estímulo, já que, habitualmente, a metoclopramida induz a liberação da aldosterona. A infusão da vasopressina investigou a atuação direta desta sobre os receptores ilícitos da arginina vasopressina V₁ (V_{1a}), V₂ e V₃ (V_{1b}).

No segundo dia de testes, a infusão do LHRH tinha como objetivo avaliar o estímulo mediado pelo próprio hormônio, pelo LH e FSH sobre a esteroidogênese. As gonadotrofinas também foram dosadas, objetivando-se comprovar a efetividade do estímulo. A administração do TRH avaliou seu estímulo direto sobre a adrenal e aquele mediado pelo TSH e prolactina, por este motivo, esses dois últimos hormônios também foram dosados. A ingestão de refeição mista investigou a modulação da esteroidogênese mediada pelos hormônios gastrointestinais, entre eles, o peptídeo inibitório gástrico (GIP).

No terceiro dia, a infusão de glucagon avaliou a atuação direta desse último sobre a adrenal. O teste postural investigou a influência da redução do peptídeo natriurético atrial e da elevação de catecolaminas, vasopressina e angiotensina II sobre a síntese de cortisol, sendo também dosadas a aldosterona e a APR.

No último dia de testes, o estímulo com o ACTH sintético tinha como objetivo comprovar o aumento da secreção do cortisol na AIMAH. Apesar de não depender do ACTH, a adrenal hiperplasiada habitualmente mantém a resposta ao estímulo desse último hormônio.

Um incremento do cortisol $\geq 50\%$, em relação ao seu valor basal, foi interpretado como uma resposta positiva ao estímulo específico; um incremento de

25% a 49% foi definido como uma resposta parcial; e um incremento < 25% foi considerado uma ausência de resposta ao estímulo, em concordância com o que já fora proposto na literatura (53).

3.3.6 Propedêutica de imagem para a investigação de meningiomas

Conforme comentado anteriormente, em 2005, Lee *et al.* (15) descreveram a ocorrência de meningiomas intracranianos em duas irmãs com AIMAH. Com base nesse relato, foi proposta aos pacientes diagnosticados com AIMAH, pertencentes à família estudada, a realização de um exame de ressonância magnética (RM) do encéfalo, com o intuito de se investigar a possibilidade da associação das duas doenças. Com a mesma finalidade, foi também proposta a outros 12 pacientes com AIMAH, atualmente acompanhados na Unidade de Suprarrenal do HCFMUSP, a realização desse exame de imagem. Esses últimos pacientes não apresentavam qualquer grau de parentesco com a família estudada.

Os exames de RM de encéfalo foram realizados no HCFMUSP, utilizando um aparelho *Signa HDxT 1.5T* (GE Healthcare, Wauwatosa, WI, EUA), sendo empregadas as seguintes técnicas: *spin echo*, com sequências ponderadas em T1, antes e após a administração de contraste paramagnético (gadolínio); *fast spin echo* (FSE) e *gradient echo* (GRE), ambas ponderadas em T2; e *fluid-attenuated inversion recovery* (FLAIR). Foram adquiridas imagens multiplanares e realizadas também sequências de difusão.

3.3.7 Exame de ^{18}F -FDG-PET/CT

Até o presente estudo, não havia na literatura nenhum trabalho descrevendo o padrão de captação da ^{18}F -FDG na AIMAH. Desta forma, com o objetivo de

caracterizar a atividade metabólica dos nódulos adrenais hiperplasiados, foi proposto a alguns pacientes diagnosticados com doença a realização de um exame de ^{18}F -FDG-PET/CT.

Para a realização do exame supracitado, foram selecionados cinco pacientes com AIMAH, três deles pertenciam à família estudada. Os outros dois casos avaliados, um com a forma esporádica da doença e o outro com a forma familiar, foram selecionados no ambulatório da Unidade de Suprarrenal do HCFMUSP. Três pacientes apresentavam SC clássica (manifesta) e os outros dois, SC subclínica.

Os exames foram realizados na Unidade de Medicina Nuclear do Hospital Israelita Albert Einstein em São Paulo/SP, em conformidade com um protocolo estabelecido na literatura e adotado pelo hospital (39, 42). Uma médica daquela instituição, especializada em medicina nuclear, participou diretamente da execução e interpretação dos exames.

Na noite anterior à realização do exame, foi prescrita para os pacientes uma dieta pobre em carboidratos. No dia do exame, após um período de 6 horas de jejum, a glicemia capilar dos pacientes foi avaliada e diante de um valor menor que 150 mg/dL, o exame ^{18}F -FDG-PET/CT foi realizado. O radiotraçador (^{18}F -FDG) foi administrado por via intravenosa, através da punção da veia antecubital, nas doses de 0,15-0,2 mCi/kg (5,55-7,40 MBq/kg). A dose menor foi utilizada nos pacientes com menos de 70 kg e a maior nos pacientes mais pesados. O escaneamento foi realizado em dois momentos, após 60 e 120 minutos da injeção do radiotraçador. As imagens foram obtidas desde a base do crânio até o terço superior da coxa, utilizando-se um aparelho *GE Discovery ST PET/CT Hybrid Scanner* (GE Healthcare, Waukesha, WI, EUA). Primeiro, foi realizada a TC com cortes axiais de 3,8 mm de espessura e, em

seguida, esses mesmos segmentos foram avaliados pela PET. Para cada posição da mesa, o tempo de aquisição das imagens foi de 3 ou 4 minutos, respectivamente para pacientes eutróficos e obesos. As imagens da TC e da PET foram reconstruídas e sobrepostas, utilizando-se o algoritmo de maximização da expectativa do subconjunto organizado (algoritmo de OSEM). Posteriormente, as imagens foram disponibilizadas em estações de trabalho *Xeleris* (GE Healthcare, Waukesha, WI, EUA) em três dimensões, nos planos axial, coronal e sagital. Foram calculados o valor padrão de captação máxima (SUVmax) das adrenais e de áreas homogêneas de cerca de 13 cm², no segmento VIII do fígado. Nessa mesma região do fígado, foi calculado também o valor padrão de captação médio (SUVmédio).

3.3.8 Análise estatística do estudo clínico

A análise estatística foi realizada com os programas *IBM SPSS Statistics 2010*, versão 19.0 (IBM Corporation, New York, EUA) e *BioEstat 2007*, versão 5.3 (Instituto Mamirauá, Tefé, Brasil). A distribuição normal das variáveis numéricas foi avaliada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Os testes t de *Student* e de *Wilcoxon-Mann-Whitney* foram utilizados para comparar as variáveis numéricas, quando apropriados. A comparação das variáveis categóricas foi feita pelo teste exato de *Fisher* ou Qui-Quadrado, quando apropriados. Utilizou-se a correlação linear de *Pearson* para a avaliação do grau de associação entre duas variáveis numéricas. Para o cálculo da razão de chances (*odds ratio*), foram realizadas as regressões logísticas simples e múltipla. No estudo clínico, um p-valor < 0,05 foi utilizado para rejeitar-se a hipótese de nulidade, sendo o resultado considerado estatisticamente significativo.

3.4 Estudo molecular

Concomitante ao estudo clínico supracitado, foi conduzido um estudo molecular com o objetivo de se mapear regiões cromossômicas e loci potencialmente relacionados à etiologia genética da AIMAH familiar. Nesta etapa do estudo, foram utilizadas diferentes técnicas de biologia molecular em uma sequência lógica (Figura 7).

Figura 7. Principais etapas do estudo molecular conduzido para a investigação da etiologia genética da AIMAH familiar. Polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms* – SNPs).

3.4.1 Extração de DNA genômico de leucócitos do sangue periférico

Amostras de sangue venoso periférico foram colhidas de cada membro da família estudada, em três tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (*Vacutainer K2 EDTA 7.2 mg, Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA*). A técnica de *salting-out* modificada (precipitação por salificação) foi utilizada para a extração do DNA genômico das amostras de sangue (131). Inicialmente, foi realizada a lise

das hemácias. Nessa etapa, o sangue foi misturado a uma solução de lise (NH_4Cl a 114 mM, NH_4HCO_3 a 1 mM) e incubado a 4 °C por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 4 °C durante 15 minutos, e o sobrenadante foi desprezado. Todo o procedimento para a lise das hemácias foi então repetido mais uma vez. Na etapa seguinte, foi realizada a lise dos leucócitos. O botão leucocitário, inicialmente, foi suspenso em 9 mL de solução de lise de glóbulos brancos, contendo: TE (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM pH 8,0), 180 mcL de dodecilsulfato de sódio a 10% (*Sigma*, St. Louis, MO, EUA) e 150 mcL de proteinase K a 10 mg/mL (*Gibco BRL*, Gaithersburg, MD, EUA). Em seguida, essa solução foi incubada a 37 °C por 18 horas. Após esse período, foram adicionados 3,6 mL de solução saturada de NaCl a 6 M, e o material foi vigorosamente agitado por 15 segundos e centrifugado por 15 minutos. Na etapa seguinte, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e o DNA foi precipitado, acrescentando-se dois volumes de etanol absoluto gelado. Após a homogeneização cuidadosa, o DNA precipitado foi retirado do tubo e, em seguida, lavado em etanol a 70% durante 5 minutos. Essa última operação foi repetida por mais três vezes. Finalmente, o DNA foi lavado em etanol absoluto e, em seguida, centrifugado a vácuo (*Concentrator 5301*, *Eppendorf*, Hamburg, Alemanha). Após todo esse processo, o DNA foi ressuspenso em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0).

A concentração do DNA foi medida em um espectrofotômetro (*Biophotometer*, *Eppendorf*, Hamburg, Alemanha), no comprimento de onda de 260 nm. Uma relação acima de 1,8 entre as leituras 260 e 280 nm foi considerada ideal para caracterizar a pureza do material.

3.4.2 Reação em cadeia da polimerase e sequenciamento do gene *MC2R*

Conforme discutido anteriormente, a mutação do gene do receptor do ACTH (*MC2R*) é uma causa extremamente incomum de AIMAH, tendo sido descrito somente um caso na literatura. Diante desse relato anterior, decidiu-se sequenciar o gene *MC2R* no caso índice da família, antes de se iniciar o estudo de ligação genética em escala genômica utilizando SNPs (*SNP-based genome-wide linkage study*).

A amplificação da região codificadora do gene *MC2R* (sequência de referência: ENST00000399821/ NM_000529.2) foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR). Utilizou-se o DNA genômico e oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) intrônicos específicos para a amplificação da região de interesse (Tabela 9).

Tabela 9. *Primers* utilizados para a amplificação da região codificadora do *MC2R*.

Éxon	<i>Primers</i> senso	<i>Primers</i> antissenso
1	5' TAAGCGAGTGTGGCTGGTTT 3'	5' ATGGTCACGATGCTGTGGTA 3'
	5' TCGACTCCCTGTTTGTCTC 3'	5' CACTGGCATTGTGGAATG 3'

Utilizou-se o programa *Primer3Plus* (versão 2007) para o desenho dos *primers*. Adenina (A); citosina (C); guanina (G); e timina (T).

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25 µL, contendo: 50 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTPs) (*Life Technologies Corporation*, Foster City, CA, EUA), 15 pmol de cada *primer* específico (*Integrated DNA Technologies*, Coralville, IA, EUA), 0,75 U da enzima *Go Taq® DNA Polymerase* (*Promega Corporation*, Madison, WI, EUA) e 5 µL da solução tampão *5x Green Go Taq Reaction Buffer* (*Promega Corporation*, Madison, WI, EUA). A PCR foi realizada em um termociclador *Veriti* (*Life Technologies Corporation*, Foster City, CA, EUA) e consistiu nas seguintes etapas: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30

segundos, de anelamento dos *primers* a 60 °C por 30 segundos e de extensão a 72 °C por 40 segundos; e extensão final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com *SYBR Safe DNA Stain* (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, EUA) e visualizados por transiluminação em luz ultravioleta. A intensidade do sinal emitido pelos produtos da PCR foi comparada àquela emitida pelo *Low DNA Mass Ladder* (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, EUA), um marcador de peso molecular cuja concentração era conhecida, permitindo, assim, quantificar o DNA amplificado.

Os produtos da PCR foram incubados com as enzimas fosfatase alcalina de camarão e exonuclease I a 37 °C por 15 minutos e, posteriormente, a 80 °C por mais 15 minutos. Essas enzimas, contidas no produto comercial *ExoSAP-IT* (Affymetrix Inc., Cleveland, OH, EUA), permitiram a purificação do DNA amplificado. A essa solução purificada, foi adicionado 1 mL de *Big Dye Terminator* (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, EUA), 1 mL de tampão *Save Money* (Tris-HCl 0,2 mM; MgCl₂ 5 mM) e 5 pmol de um dos *primers* (senso ou antissenso), realizando-se, em seguida, a reação de sequenciamento em um termociclador *Veriti* (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, EUA): 25 ciclos a 96 °C por 10 segundos, a 50 °C por 5 segundos e a 60 °C por 4 minutos. Os produtos dessa reação foram submetidos à eletroforese capilar em um sequenciador automático *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, EUA) e o eletroferograma gerado foi analisado pelo programa *Sequencher 5.0.1* (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EUA). As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas na base de dados do *National Center for Biotechnology and Information* (NCBI).

3.4.3 Estudo de ligação genética utilizando microssatélites específicos

Os microssatélites são regiões compostas por unidades de repetição de um a seis nucleotídeos em tandem dentro do genoma. Mais frequentemente, eles são constituídos por repetições de dois nucleotídeos, sendo a repetição citosina-adenina (CA) a mais comum (ex. CACACACACACACA). O polimorfismo dos microssatélites deve-se, sobretudo, à variabilidade do número de repetições, sendo assim, múltiplos alelos podem ser encontrados em um determinado locus (132). A análise dos microssatélites é bastante utilizada na biologia molecular, com diversas aplicações práticas. Nos estudos de ligação genética (*linkage studies*) utilizando microssatélites, é avaliado se um determinado alelo do microssatélite segrega dentro da genealogia, acompanhando um fenótipo específico ou mesmo uma doença. Caso isso ocorra, é possível que um gene próximo a esse microssatélite em questão seja o responsável pelo fenótipo ou pela doença naquela família.

Neste estudo de ligação genética, foram utilizados microssatélites disponibilizados pelo *kit* comercial *ABI Prism Linkage Mapping Set Version 2.5* (*Life Technologies Corporation*, Foster City, CA, EUA). É importante destacar que, embora a variabilidade dos microssatélites favoreça o emprego dos mesmos nos estudos de ligação genética, alguns pontos negativos têm atualmente desencorajado a utilização inicial desses marcadores nesse tipo de estudo. Primeiramente, a distância entre os microssatélites no *kit* comercial utilizado é muito grande, cerca de 10 centimorgans (cM). Ou seja, a possibilidade de ocorrer uma recombinação (*crossing-over*) entre dois microssatélites contíguos é de cerca de 10% em cada meiose, o que pode comprometer sobremaneira a interpretação dos resultados. Além disso, a genotipagem dos microssatélites não é automatizada, ou seja, é preciso realizar uma

reação de PCR para cada microssatélite de cada indivíduo, o que aumenta muito o tempo do estudo e, sobretudo, os custos. Desta forma, adotou-se a seguinte estratégia, foram definidos alguns genes candidatos, potencialmente relacionados à etiopatogênese da AIMAH e foi investigado se microssatélites próximos a esses genes segregavam junto com a doença dentro da família estudada. Os genes estudados e os microssatélites do *kit* comercial que foram genotipados estão demonstrados na tabela a seguir (Tabela 10).

Tabela 10. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites específicos.

Gene	Localização citogenética do gene (OMIM)	Microssatélites	Distância do microssatélite em relação ao gene em megabases (Mb)
<i>MC2R</i>	18p11.21	D18S53	2,39 Mb
		D18S478	8,11 Mb
<i>PRKARIA</i>	17q24.2	D17S944	5,07 Mb
		D17S949	1,93 Mb
<i>GNAS</i>	20q13.32	D20S100	3,1 Mb
		D20S171	0,32 Mb
		D20S173	1,39 Mb
<i>MEN1</i>	11q13.1	D11S4191	4,57 Mb
<i>APC</i>	5q22.2	D5S2027	0,90 Mb
		D5S471	6,87 Mb
<i>FH</i>	1q43	D1S2785	0,78 Mb
		D1S2842	1,19 Mb

Melanocortin 2 receptor (MC2R); protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha (PRKARIA); GNAS complex locus (GNAS), multiple endocrine neoplasia type I (MEN1); adenomatous polyposis coli (APC); e fumarate hydratase (FH).

É importante destacar que nenhum dos genes estudados era, de fato, um forte candidato. Os membros da família diagnosticados com AIMAH não apresentavam qualquer característica clínica que sugerisse a presença de uma síndrome genética associada às mutações dos genes *MEN1*, *APC* ou *FH*. A mutação do *MC2R*, como já mencionado, é extremamente incomum na AIMAH. Em investigações anteriores, o

PRKARIA não se encontrava mutado na doença e as mutações no *GNAS*, já descritas na AIMAH, eram somáticas.

A metodologia para a genotipagem dos microssatélites é baseada na amplificação por PCR das regiões que contêm esses marcadores. Durante a genotipagem, foram utilizados DNA genômico dos pacientes e uma solução já contendo os *primers* senso e antissenso marcados com fluorescência, fornecidos pelo *kit* comercial supracitado. Em conformidade às orientações do *kit*, as reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 15 µL, contendo: 60 ng de DNA genômico, 0,375 µL da solução de dNTP a 10 mM (*Life Technologies Corporation*, Foster City, CA, EUA), 5 pmol de cada *primer* específico (*Life Technologies Corporation*, Foster City, CA, EUA), 0,6 U da enzima *AmpliTaq Gold DNA Polymerase* (*Life Technologies Corporation*, Foster City, CA, EUA), 1,5 µL da solução tampão *Buffer II* (Tris-HCl a 100 mM, pH 8.3 e KCl a 500 mM) (*Life Technologies Corporation*, Foster City, CA, EUA) e 1,5 µL da solução de MgCl₂ a 25 mM (*Life Technologies Corporation*, Foster City, CA, EUA). A PCR foi realizada em um termociclador *Veriti* (*Life Technologies Corporation*, Foster City, CA, EUA) e consistiu das seguintes etapas: desnaturação inicial a 95 °C por 12 minutos; 10 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, de anelamento a 55 °C por 15 segundos e de extensão a 72 °C por 30 segundos; seguidos de 20 ciclos de desnaturação a 89 °C por 15 segundos, de anelamento a 55 °C por 15 segundos e de extensão a 72 °C por 30 segundos; terminando com extensão final a 72 °C por 10 minutos. As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese capilar no sequenciador automático *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (*Life Technologies*

Corporation, Foster City, CA, EUA) e analisadas pelo programa de análise de fragmentos *GeneScan* (*Life Technologies Corporation*, Foster City, CA, EUA).

3.4.4 Estudo de ligação genética em escala genômica utilizando SNPs

O polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism* – SNP) é uma variação frequente na sequência do DNA, envolvendo um único nucleotídeo e que, por definição, deve estar presente em pelo menos 1% da população (133). Os SNPs constituem a variação genética mais frequente no genoma humano, estima-se que este polimorfismo ocorra a cada 100 a 300 pares de bases (bp). Eles são geralmente bialélicos, raramente formas tri ou tetra-alélicas podem ser encontradas e, nesse aspecto, são marcadores genéticos menos polimórficos que os microssatélites. Embora distribuídos por todo o genoma, os SNPs ocorrem com maior frequência em regiões não codificadoras (134).

Apesar de menos polimórficos que os microssatélites, os SNPs tornaram-se os marcadores mais frequentemente utilizados nos estudos genéticos de doenças monogênicas ou complexas, em função de sua grande densidade no genoma humano e dos avanços das técnicas de genotipagem (133). O desenvolvimento da tecnologia *GeneChip* da *Affymetrix* (*Affymetrix Inc.*, Santa Clara, CA, EUA) permitiu a genotipagem concomitante de vários SNPs, por meio de hibridização e detecção de fluorescência. Os primeiros *arrays* (*GeneChip Mapping 10K Xba131 Array*, *Affymetrix Inc.*, Santa Clara, CA, EUA) permitiam a genotipagem de cerca de 10 mil SNPs. Utilizando essa técnica, foi possível mapear regiões cromossômicas relacionadas a muitas doenças monogênicas, inclusive, endocrinológicas (135). Em meados de 2010, esses primeiros *arrays* foram retirados do mercado, em virtude do

lançamento de um outro que permitia a genotipagem de mais de 900 mil SNPs (*Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0*, *Affymetrix Inc.*, Santa Clara, CA, EUA). Para a realização do presente estudo, foi utilizado este último *array*, com uma altíssima densidade de SNPs.

Dos 96 pacientes avaliados na família, 24 (todos os 15 casos da doença e 9 controles) foram selecionados para o estudo de ligação genética em escala genômica utilizando SNPs (*SNP-based genome-wide linkage study*). Todos os controles foram selecionados dentro da família estudada, demonstravam propedêuticas laboratoriais e radiológicas (TC das adrenais) sem alterações e apresentavam idade superior a 60 anos. Diante da possibilidade da doença manifestar-se somente em fases mais tardias da vida, não foram incluídos no estudo de ligação genética indivíduos-controle mais jovens, o que, de certa forma, limitou o número de controles.

A genotipagem dos SNPs e a análise de bioinformática foram realizadas no Laboratório *Prognomix* em Montreal/QC, no Canadá, em colaboração com um grupo de pesquisa chefiado pelo Dr. André Lacroix. Permaneci na Universidade de Montreal durante 5 meses, participando ativamente de todos os experimentos que integraram esta etapa do projeto de pesquisa, inclusive da análise de bioinformática dos dados. Os experimentos foram conduzidos em conformidade com um protocolo estabelecido e padronizado pela *Affymetrix*, demandando a utilização de inúmeros reagentes, em uma série de reações. Todos os experimentos realizados e os reagentes utilizados encontram-se detalhados em um manual, disponível no site da *Affymetrix* (www.affymetrix.com.br) (136).

A figura seguinte retrata, de forma esquemática, as principais etapas do processo de genotipagem dos SNPs, utilizando a plataforma *Affymetrix Genome-*

Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, EUA) (Figura 8) (137).

Figura 8. Principais etapas do processo de genotipagem dos SNPs. Enzima de restrição (RE); reação em cadeia da polimerase (PCR).

Extraído da referência (137).

Em linhas gerais, inicialmente, verificou-se a integridade das amostras de DNA genômico em uma eletroforese em gel de agarose a 1%. Em seguida, foi realizada a digestão de 500 ng de DNA de cada indivíduo, utilizando-se duas enzimas de restrição, Nsp1 e Sty1 (*Affymetrix Inc.*, Santa Clara, CA, EUA). Os fragmentos gerados pela digestão enzimática foram ligados a adaptadores e um *primer* genérico, que reconhece as sequências específicas dos adaptadores, foi utilizado para a amplificação por PCR dos fragmentos de DNA. A efetividade do processo de digestão foi confirmada por meio de uma eletroforese em gel de agarose

a 2%, demonstrando-se a amplificação preferencial dos fragmentos de 200 a 1.100 bp. O produto de PCR de cada enzima de restrição foi então misturado, purificado por meio da técnica de *beads* magnéticos e quantificado em um espectrofotômetro. As sequências de DNA já purificadas foram, em seguida, fragmentadas, obtendo-se segmentos de DNA com menos de 180 bp. A efetividade do processo de fragmentação também foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose a 4%. As extremidades dos fragmentos de DNA foram marcadas com biotina, realizando-se, em seguida, a hibridização desses fragmentos com o *GeneChip Genome-Wide Human SNP Array 6.0* (Figura 9) (138).

Figura 9. Representação do *GeneChip Scanner 3000 7G* e do cartucho contendo em seu interior o *GeneChip Genome-Wide Human SNP Array 6.0*.

Modificado da referência (138).

Ao término do processo de hibridização, o *array* (*GeneChip*) foi lavado e, em seguida, corado com um reagente contendo estreptavidina conjugada com ficoeritrina, capaz de emitir fluorescência. Por fim, utilizando-se o *Affymetrix*

GeneChip Command Console (AGCC) Software, realizou-se a leitura do *array* no *GeneChip scanner 3000 7G*, tornando possível a genotipagem dos SNPs.

3.4.5 Análise de bioinformática

A análise de ligação genética (*linkage*) é um método estatístico utilizado para se tentar localizar regiões cromossômicas potencialmente relacionadas a uma doença (139). O parâmetro de interesse na análise de *linkage* é a fração de recombinação. Quanto mais perto um marcador genético estiver do gene responsável pela doença, menor será a frequência de recombinação (*crossing-over*) entre os dois, em cada meiose. Desta forma, diante de uma fração de recombinação baixa, o marcador e o gene da doença tenderão a segregar juntos dentro da genealogia (140). Nos estudos de *linkage* em escala genômica utilizando SNPs, investiga-se, fundamentalmente, quais seriam os SNPs que tenderiam a cossegregar com a doença, ao longo das gerações. Basicamente, busca-se por regiões do genoma compartilhadas pelos indivíduos doentes com uma frequência maior do que a esperada.

Antes de iniciar a análise de *linkage*, propriamente dita, é fundamental avaliar a qualidade da genotipagem dos SNPs. Por meio do programa *Affymetrix Genotyping Console Software*, do algoritmo *Birdseed Version 2* e de modelos matemáticos, foram avaliados: o número de SNPs genotipados (*quality control call rate*), a capacidade de discriminação correta dos SNPs (*contrast quality control*), a presença de inconsistências mendelianas e relacionadas ao sexo, a taxa de heterozigosidade e a frequência de cada alelo genotipado. Foram ainda removidos SNPs especiais de controle da *Affymetrix* e realizada a configuração dos dados para a posterior utilização de outros programas específicos de bioinformática.

Uma vez confirmada a qualidade da genotipagem, foi realizada a análise de *linkage* com diferentes ferramentas de bioinformática disponibilizadas pelo programa SAGE (*Statistical Analysis for Genetic Epidemiology*) (141). Os resultados das análises de *linkage* são frequentemente reportados como um *LOD score* (logaritmo na base 10 de uma razão de verossimilhança), sendo esse determinado para cada marcador genético estudado. Em um estudo de *linkage* utilizando SNPs como marcadores, um *LOD score* elevado falaria a favor da cossegregação do SNP e da doença na família, permitindo supor que genes próximos àquele SNP específico estejam relacionados à doença em questão. Geralmente, propõe-se que um valor de *LOD score* ≥ 3 seja considerado uma evidência significativa de *linkage* e que um valor ≥ 2 seria sugestivo de *linkage* (140, 142). É possível também realizar o cálculo do p-valor com base no *LOD score*, embora essa não seja uma tarefa fácil. Alguns autores propõem que um valor de *LOD score* = 3 seria equivalente a um p-valor de cerca de 0,0001 (1×10^{-4}); no entanto, essa relação não é simples, podendo variar de acordo com a ferramenta de bioinformática utilizada (142). Estudos de *linkage* mais recentes, utilizando *arrays* com uma densidade muito alta de SNPs, têm encontrado valores de *LOD score* muito elevados em vários loci, inviabilizando a utilização dos pontos de corte anteriormente propostos. Apesar disso, novos valores de referência ainda não foram sugeridos (143).

Na análise de *linkage*, testes paramétricos e não paramétricos podem ser empregados para o cálculo do *LOD score* e/ou p-valor. Nos testes paramétricos é possível especificar, por exemplo, o padrão de transmissão da doença, sua penetrância, entre outros parâmetros; nos testes não paramétricos estas especificações não são definidas. No presente estudo, durante a análise de

bioinformática, foram empregados dois testes não paramétricos (SIBPAL e LODPAL) e um teste paramétrico (LODLINK), todos disponibilizados pelo programa SAGE (141).

Para a aplicação dos testes não paramétricos, foi necessária a utilização prévia de dois outros programas de bioinformática. O programa FREQ permitiu estimar a frequência dos alelos e o coeficiente de endogamia (*inbreeding coefficient*). Pelo programa GENIB, calculou-se a proporção de marcadores (SNPs) idênticos por descendência (*identity by descent* - IBD). É importante lembrar que dois alelos são considerados idênticos por descendência, quando ambos são cópias de um mesmo alelo proveniente de um ancestral em comum. Por meio do programa de bioinformática SIBPAL, avaliou-se quais eram os marcadores (SNPs) idênticos por descendência que estavam presentes nos irmãos doentes e ausentes nos irmãos saudáveis, tornando-se possível o cálculo do p-valor. Quanto menor o p-valor de um SNP, maior a probabilidade deste estar ligado ao gene da doença. O programa SIBPAL tem como principal limitação o fato de permitir, dentro da genealogia, a comparação somente dos irmãos. Pelo programa de bioinformática LODPAL, avaliou-se quais eram os marcadores IBD compartilhados por todos os parentes afetados, tornando-se possível o cálculo do *LOD score*. Quanto maior o *LOD score* de um SNP, maior a probabilidade deste estar ligado ao gene da doença.

Para a utilização do teste paramétrico LODLINK, foi necessário utilizar primeiro o programa SEGREG, com o qual foram definidos parâmetros relacionados à segregação e à penetrância da doença. Nessa análise de linkage, foi atribuída à doença um padrão de herança autossômico dominante (com base na análise do

heredograma) e foi empiricamente imputada à mesma uma penetrância de 90%. Os resultados do LODLINK foram expressos tanto em *LOD score*, como em p-valor.

3.4.6 Reação em cadeia da polimerase e sequenciamento de genes suspeitos

Com base nos resultados do estudo de *linkage* utilizando SNPs, foi realizado o sequenciamento de três genes suspeitos, localizados em uma região do genoma potencialmente relacionada à AIMAH familiar. Pesquisou-se a presença de mutações nesses genes em três pacientes da família estudada (dois casos e um controle).

Foi realizada a amplificação por PCR das regiões codificadoras dos seguintes genes: gene do receptor 56 acoplado à proteína G (*GPR56*) (sequência de referência: ENST00000568909 / NM_005682.5); gene do receptor 97 acoplado à proteína G (*GPR97*) (sequências de referência: ENST00000333493 / NM_170776.4 e ENST00000327655); gene do receptor 114 acoplado à proteína G (*GPR114*) (sequência de referência: ENST00000340339 / NM_153837.1). Utilizando-se as sequências de referência supracitadas, foram sequenciadas as regiões codificadoras de todas as isoformas desses genes. Na tabela seguinte estão descritas as sequências dos *primers* utilizadas nas PCRs (Tabela 11).

O protocolo utilizado para a amplificação e sequenciamento dos genes supracitados foi exatamente o mesmo descrito anteriormente no item 3.4.2, para o estudo do gene *MC2R*, inclusive as temperaturas de cada etapa da PCR.

Tabela 11. *Primers* utilizados para a amplificação das regiões codificadoras dos genes *GPR56*, *GPR97* e *GPR114*.

Gene	Éxons	<i>Primers</i> senso	<i>Primers</i> antissenso
<i>GPR56</i>	2	5' CACACTGGCCTCCTCTTCTG 3'	5' AGCCGAGCTGTAAGTGCCTA 3'
	3	5' TAGGTCCTGTCCCCTTCCAT 3'	5' CCCAGTCCACTTTGCATTTT 3'
	4	5' GTCATGTCAGGGTGGTAGGG 3'	5' GTTGACTCCCAGAAGGCAGA 3'
	5	5' CTGCCTCTTCCCTGTGTCTC 3'	5' ACTGAGCTTCAGGGAGTGCT 3'
	6	5' GAGGAGGGCTGTCATGAGTC 3'	5' TTTGACTCCCAGAGGAAGGA 3'
	7	5' GAGAGGGTAAGGGGCTTCTG 3'	5' ACTTTACAGGCCAGGCAGAG 3'
	8	5' TGGTGGCTTGACTGTGTTCT 3'	5' GGAAGCCCTCGGTGATTAAC 3'
	9	5' TGACACAGTCGTGCTTTTGG 3'	5' CCTTGGAGAGCTGTTATGAGG 3'
	10	5' GTTGGGAGAGGGGGTTCTTA 3'	5' CAGCTTACCCCAAACAGCTC 3'
	11	5' AGGATAGGGGCCATGTATGA 3'	5' GATAGGTGGAGAGGCAGAACC 3'
	12	5' CAGGAGCCCAAACCTTCAGAG 3'	5' CCTTTTCTCACCTCCATGA 3'
	13	5' CCCAGTGATTTCTGCCTCAC 3'	5' AGGTTCCCTGGGTGATCTCT 3'
	14	5' TTGGCAAACACTATGGAGAGG 3'	5' GAGCTGAGTGAGAGCCGAGT 3'
<i>GPR97</i>	1	5' CGTAGATCCCACCCAGTG 3'	5' ACCCAAACCTCTACCTTCT 3'
	2	5' TGGAATTCTAGCCCAACCAC 3'	5' TGGTGTCAAACAAGGTGGAA 3'
	3	5' GTCCTGATCCCAGGGTCTTT 3'	5' GGAGGGACAAGCCCTAGTTA 3'
	4	5' CTACCCAGTGTGCCTGCTTC 3'	5' ACGGGCTGCATTAGAAACAC 3'
	5	5' GTCCCCTGGTCTCGAACTCT 3'	5' GTATGGCCCTAATGGCTCCT 3'
	6	5' ATGGGTGTGAACCTTGCTTT 3'	5' GGACTCAGCCAGTGGAGCTA 3'
	7	5' TCCTCTTTGCTCCCTGCAT 3'	5' CAGGCCCATATACCCAAAGA 3'
	8	5' GTAACAGCCCCCTCCACTCT 3'	5' AGAGGCTGCACAACCTGAAT 3'
	9	5' TAGGCTATTGGGGTGGACAG 3'	5' CTCTCCCCAAGGCTATTTC 3'
	10	5' GGAAATAGCCTTGGGGAGAG 3'	5' TGGATCTGAGGATTCTTCTGG 3'
	11	5' GGAGAGGCACCTTCACAGAC 3'	5' TCTTGCAAACCACCCTCTTC 3'
	12	5' TGAGTGGTTACGGTGGGTCT 3'	5' GATCTGGATGGGACCTCTGA 3'
	12*	5' GGGGAGCAGTGAGTGTTGAC 3'	5' TTACCATCCCTGAGGCTTTG 3'
<i>GPR114</i>	2	5' ACTCTTGGGACATGCCAGAC 3'	5' AAGCCTAAGTGGCCCTTTTC 3'
	3	5' ATGGAAAGCCCAGAGGTTGT 3'	5' ATCCCCAGAGCCTAGTGTCA 3'
	4	5' GTGTGCAGTGGTCTGGAGGT 3'	5' GACCTTAAATGCCTGGAGGA 3'
	5	5' GAAGGTTCTGTGGGTGGAAA 3'	5' GACAATTGCTGGCTTGGATT 3'
	6	5' CGTGAAAGTCTTGCTGCTTG 3'	5' CCAAGATGGTTCCACAGGTT 3'
	7	5' GCCAGTGCCTGGTAAATGT 3'	5' ACTTTCTGTCCCTTGCACCA 3'
	8	5' CTTGTTCAAGCCAGGTCCAT 3'	5' CTGGAGAAGCACACCCAGTT 3'
	9	5' CCTTCTTCGCCTCAGTTTCC 3'	5' TTCACAGCTGGTGGTCATGT 3'
	10	5' GGGCTCACAACAGTCTCCTC 3'	5' CCTGCAAACCTCCCTGTCTA 3'
	11	5' GGGGTTTCACTGTGTGTTCA 3'	5' CCTGAACCCCTTTAGCAGTG 3'
	12	5' CAGCTCTTCAGCTCTGAGG 3'	5' CCCCAGGTAAGGTTGGATCT 3'

Utilizou-se o programa *Primer3Plus* (versão 2007) para o desenho dos *primers*. 12* refere-se ao éxon 12 da sequência de referência ENST00000327655 do *GPR97*; para o desenho dos demais *primers* desse gene, usou-se a sequência de referência ENST00000333493 / NM170776.4. Adenina (A); citosina (C); guanina (G); e timina (T).

4 Resultados

4.1 Estudo clínico

4.1.1 Achados clínicos e laboratoriais

Após avaliar 96 membros da família, foram diagnosticados 13 novos casos de AIMAH, totalizando 15 casos da doença na genealogia estudada (7 mulheres e 8 homens) (Figura 10 e Anexo A). Conforme mencionado anteriormente, para se estabelecer o diagnóstico da AIMAH era necessária a confirmação da perda da supressividade do cortisol no TSDexa e/ou a demonstração da elevação do cortisol salivar à meia-noite, em um paciente com alterações radiológicas compatíveis com a doença (presença de um ou mais nódulos adrenais > 1 cm e/ou o espessamento de uma ou ambas as glândulas).

Na família estudada, observou-se que a doença ocorria em três gerações consecutivas e, aparentemente, podia ser transmitida para as gerações subsequentes tanto pelo sexo masculino (pai) como pelo feminino (mãe). Demonstrou-se também, em alguns segmentos da família, um grande número de irmãos com a doença (geração IV). Os membros da família avaliados eram de cor branca e embora todos os indivíduos da geração III tenham nascido na mesma região, no Alto Paranaíba (Mesorregião do Triângulo Mineiro), no Estado de Minas Gerais, não havia na genealogia o relato de casamentos consanguíneos.

Entre os indivíduos da família diagnosticados com AIMAH, o mais jovem tinha 32 anos e o mais velho 74 anos; a idade média ao diagnóstico foi de $52,8 \pm 11,3$ anos (Tabelas 12 e 13).

Figura 10. Heredograma da família com AIMAH.

Tabela 12. Propedêutica inicial dos pacientes diagnosticados com AIMAH familiar.

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

Em vermelho estão destacados os valores hormonais alterados. Idade (na época do diagnóstico da AIMAH); parentesco (em relação ao caso índice); cortisol (F); teste de supressão com 1 mg de dexametasona via oral à meia-noite (TSDexa); valor de referência (VR); dexametasona (Dexa); tomografia computadorizada (TC); adrenal (Ad.); direita (D); esquerda (E). * No caso específico deste paciente, o cortisol sérico foi dosado por ensaio fluorimétrico, as demais dosagens foram realizadas com os kits descritos anteriormente no item 3 deste trabalho (métodos); # (dados não disponíveis). Todos os nódulos suprarrenais descritos nas tomografias acima apresentavam diâmetro maior que 1 cm.

Tabela 13. Propedêutica laboratorial complementar dos pacientes diagnosticados com AIMAH familiar.

Indivíduo	Sexo	Idade (anos)	F total em urina de 24 h (VU) (VR em mcg/24 h)	F livre em urina de 24 h (VU) (VR em mcg/24 h)	ACTH (VR em pg/mL)	SDHEA (VR em ng/mL)	Δ 4 (VR em ng/mL)	Testosterona total (VR em ng/dL)
III-29	F	74	#	91 (1200 mL) (21-111)	5,0 (≤ 46)	#	#	#
III-32	F	70	78 (1960 mL) (50-310)	#	5,21 (≤ 63,3)	123 (94-2460)	< 0,3 (< 0,3-2,3)	< 11 (≤ 98)
III-35	F	67	121 (2420 mL) (50-310)	51 (3500 mL) (21-111)	18,3 (≤ 46)	144 (94-2460)	0,8 (< 0,3-2,3)	< 11 (≤ 98)
IV-4	M	59	85 (1700 mL) (50-310)	72,6 (1160 mL) (21-111)	13 (≤ 46)	264 (517-2950)	0,7 (1,1-2,7)	433 (271-965)
IV-7	F	52	521 (1850 mL) (50-310)	#	< 5 (≤ 46)	< 80 (354-2560)	< 0,3 (< 0,3-1,7)	< 11 (≤ 98)
IV-9	F	55	#	36,2 (2000 mL) (21-111)	16,7 (≤ 46)	295 (354-2560)	0,5 (< 0,3-1,7)	< 11 (≤ 98)
IV-10	M	54	72 (1800 mL) (50-310)	49,7 (1180 mL) (21-111)	13 (≤ 46)	231 (443-3310)	0,3 (1,1-2,7)	283 (271-965)
IV-13	F	53	90 (1000 mL) (50-310)	#	#	107 (354-2560)	< 0,3 (< 0,3-1,7)	< 11 (≤ 98)
IV-18	M	45	374 (1020 mL) (30-300)	#	< 16,7 (< 80)	163 (800-5600)	0,8 (0,8-2,8)	380 (271-965)
IV-30	M	49	304 (1900 mL) (50-310)	109,4 (1900 mL) (21-111)	8,0 (≤ 46)	545 (443-3310)	1,0 (1,2-3,2)	448 (271-965)
IV-32	M	46	168 (1400 mL) (50-310)	48,9 (1400 mL) (21-111)	10 (≤ 46)	519 (443-3310)	1,0 (1,2-3,2)	424 (271-965)
IV-33	M	45	138 (1960 mL) (50-310)	51,6 (1960 mL) (21-111)	#	331 (443-3310)	0,5 (1,2-3,2)	203 (271-965)
IV-36	M	39	106 (3520 mL) (50-310)	59,1 (3520 mL) (21-111)	#	611 (889-4270)	1,3 (1,2-3,7)	713 (271-965)
IV-48	M	52	#	#	#	#	#	#
V-6	F	32	61,9 (1220 mL) (50-310)	57,6 (2000 mL) (21-111)	28 (≤ 46)	1350 (988-3400)	#	81 (≤ 98)

Em vermelho estão destacados os valores hormonais considerados alterados. Todas as dosagens hormonais foram realizadas com os kits descritos anteriormente no item 3 (métodos) deste trabalho, exceto no caso específico do paciente IV-18, cujas dosagens haviam sido realizadas em 2005 pelos seguintes métodos: F total em urina de 24 h (fluorimunoensaio), ACTH (ensaio imunoradiométrico), SDHEA (quimioluminescência), Δ 4 (radioimunoensaio) e testosterona (fluorimunoensaio). Nos pacientes IV-30, IV-32, IV-33 e IV-36, a mesma amostra de urina foi dosada pelos dois métodos. Cortisol (F); volume urinário (VU); valor de referência (VR); hormônio adrenocorticotrófico plasmático (ACTH); sulfato de desidroepiandrosterona sérica (SDHEA); adrostenediona sérica (Δ 4); # (dados não disponíveis).

Todos os pacientes com AIMAH familiar demonstraram, nos exames laboratoriais, uma perda da supressividade do cortisol à dexametasona e nos exames de imagem, alterações radiológicas compatíveis com a doença (Tabela 12). No entanto, em somente 21% desses pacientes (3/14) foi documentada, na avaliação inicial, uma elevação do cortisol salivar à meia-noite (sensibilidade diagnóstica de 21%). Os pacientes diagnosticados com AIMAH familiar apresentavam as enzimas hepáticas (alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase) e as escórias nitrogenadas (ureia e creatinina) dentro dos valores normais, exceto o paciente IV-10, cujas enzimas hepáticas estavam discretamente elevadas (ALT = 76 U/L, VR < 41 U/L; ASP = 70 U/L, VR < 37 U/L), em razão de um quadro de esteato-hepatite não alcoólica.

Durante a complementação da propedêutica laboratorial (Tabela 13), foi demonstrado que somente 14% dos pacientes com AIMAH familiar (2/14) apresentavam um cortisol urinário aumentado (sensibilidade diagnóstica de 14%). Em 46% dos pacientes com a doença (5/11), o ACTH plasmático encontrava-se < 10 pg/mL, não sendo possível, pelo método analítico utilizado (SA = 5 pg/mL), detectar esse último hormônio em dois indivíduos com AIMAH. Nenhum paciente com a doença demonstrou hiperandrogenismo laboratorial, pelo contrário, a síntese androgênica adrenal tendia a estar diminuída, encontrando-se baixo o valor sérico do sulfato de desidroepiandrosterona (SDHEA) em 62% dos casos (8/13). Cerca de 86% dos pacientes com AIMAH familiar (12/14) apresentavam, ao diagnóstico da doença, uma SC subclínica, caracterizada pela escassez de sinais e sintomas relacionados ao hipercortisolismo, pela ausência da supressão normal do cortisol sérico durante o TSDexa e pelo valor normal do cortisol urinário.

Os pacientes com AIMAH familiar que apresentavam o cortisol salivar à meia-noite e/ou o cortisol urinário elevados tendiam a demonstrar valores mais altos do cortisol sérico, durante o TSDexa (Figuras 11 e 12).

Figura 11. Nos pacientes com AIMAH familiar, o valor mediano do cortisol (F) sérico (linha pontilhada), durante o TSDexa, foi significativamente maior no grupo de indivíduos com o cortisol (F) salivar elevado (Grupo 2), em relação àqueles que apresentavam este último exame normal (Grupo 1); (valor mediano de 17,8 mcg/dL e 3,3 mcg/dL, respectivamente; $p = 0,016$; teste de *Wilcoxon-Mann-Whitney*).

Figura 12. Nos pacientes com AIMAH familiar, o valor mediano do cortisol (F) sérico (linha pontilhada), durante o TSDexa, foi significativamente maior no grupo de indivíduos com o cortisol (F) urinário elevado (Grupo 2), em relação àqueles que apresentavam este último exame normal (Grupo 1); (valor mediano de 16,4 mcg/dL e 3,4 mcg/dL, respectivamente; $p = 0,030$; teste de *Wilcoxon-Mann-Whitney*).

Observou-se também que, nos pacientes com AIMAH familiar, o valor médio do cortisol sérico, durante o TSDexa, era significativamente maior nos indivíduos com ACTH mais baixo (< 10 pg/dL) (Figura 13).

Figura 13. Nos pacientes com AIMAH familiar, o valor médio do cortisol (F) sérico, durante o TSDexa, foi significativamente maior no grupo de indivíduos com o ACTH plasmático baixo (< 10 pg/dL) (Grupo 2), em relação àqueles com ACTH mais elevado (≥ 10 pg/dL) (Grupo 1); (valor médio de 14,3 $\pm$ 6,5 mcg/dL e 3,8 $\pm$ 2,5 mcg/dL, respectivamente; $p = 0,005$; teste t de *Student*).

Os principais dados clínicos obtidos durante a avaliação dos pacientes encontram-se descritos na tabela seguinte (Tabela 14). Comparou-se a prevalência dos diferentes achados clínicos, nos pacientes com AIMAH familiar (15 indivíduos) e em um grupo controle, constituído por 43 indivíduos sem a doença (cuja propedêutica fora normal), pertencentes às gerações III e IV da família. Somente o relato de ganho ponderal progressivo nos últimos 5 anos, o histórico de DM ou pré-DM, a presença de pletora e face em lua cheia demonstraram uma prevalência maior, estatisticamente significativa, no grupo com AIMAH, em relação ao grupo controle.

Tabela 14. Prevalência dos diferentes achados clínicos na AIMAH familiar.

	AIMAH (15)	Controles (43)	
Idade média	52,8 ±11,3 anos (32-74)	54,7 ±14,9 anos (32-91)	p = 0,659
Sexo	F (47%): M (53%)	F (51%): M (49%)	p = 1,000
IMC médio	29,7 ±5,4 Kg/m ²	27,3 ± 4,4 Kg/m ²	p = 0,101
Circ. abdominal aumentada	57,1%	44,2%	p = 0,593
Obesidade	33,3%	19,0%	p = 0,294
Sobrepeso ou obesidade	80,0%	73,8%	p = 0,739
Relato de ganho ponderal	66,7%	32,6%	p = 0,045
Face em lua cheia	20,0%	2,3%	p = 0,049
Pletora	26,7%	2,3%	p = 0,013
Giba	40,0%	16,3%	p = 0,077
Preenchimento de fossas	53,3%	32,6%	p = 0,263
Estrias purpúricas	0,0%	0,0%	#
Fragilidade vascular	26,7%	14%	p = 0,265
Dificuldade de cicatrização	0,0%	9,3%	p = 0,564
Edema	6,7%	4,7%	p = 1,000
Fraturas de fragilidade	0,0%	4,7%	p = 1,000
Fraqueza muscular proximal	13,3%	7,0%	p = 0,596
Histórico de depressão	40,0%	34,9%	p = 0,966
Labilidade emocional	33,3%	30,2%	p = 1,000
Cefaleia	13,3%	14,0%	p = 1,000
Hirsutismo	0,0%	0,0%	#
Acne	0,0%	4,7%	p = 1,000
Alteração menstrual	14,3%	4,5%	p = 0,431
Infecções cutâneas	0,0%	0,0%	#
Micoses	26,7%	11,6%	p = 0,218
Hipertensão	66,7%	41,9%	p = 0,175
Relato de DM ou pré-DM	46,7%	9,3%	p = 0,004
Hipercolesterolemia	73,3%	48,8%	p = 0,182
Hipertrigliceridemia	26,7%	14,6%	p = 0,431
Dislipidemia	80,0%	48,8%	p = 0,074

Índice de massa corporal (IMC); circunferência abdominal (circ. abdominal); diabete melito (DM).

Por regressão logística simples, calculou-se qual era a probabilidade (*odds ratio*) de um membro da família ser diagnosticado com AIMAH, diante da presença de um dos achados acima. A probabilidade de um indivíduo apresentar a doença na família era cerca de 15 vezes maior diante da presença de pletora (*odds ratio* = 15,3;

$p = 0,02$; intervalo de confiança de 95% (IC) = 1,6-150,8), 8 vezes maior na presença de DM ou pré-DM (*odds ratio* = 8,5; $p = 0,004$; IC = 2,0-36,2) e 4 vezes maior (*odds ratio* = 4,1; $p = 0,026$; IC = 1,2-14,4) diante do relato de ganho de peso progressivo nos últimos 5 anos. Nenhuma outra variável mostrou-se estatisticamente significativa na regressão logística simples. Os critérios da *American Diabetes Association 2012* foram utilizados para a definição de DM ou pré-DM, os critérios da *American Association of Clinical Endocrinologists 2012*, para o diagnóstico das dislipidemias e as definições no *The Seventh Report of the Joint National Committee (National Institutes of Health) 2003*, para o diagnóstico de hipertensão arterial (144-146).

Em 17 membros da família, foi observada uma discordância entre a propedêutica laboratorial e radiológica, não sendo possível, nesses casos, definir o diagnóstico de AIMAH ou mesmo excluir a presença da doença. Cinco indivíduos com a propedêutica laboratorial inicial normal demonstraram alguma alteração radiológica na TC das adrenais. Quatro desses pacientes (indivíduos III-3, III-17, III-30 e IV-55) apresentavam um nódulo único de até 1 cm de diâmetro, em somente uma das glândulas adrenais; já o indivíduo III-45 apresentava um espessamento discreto das asas medial e lateral da adrenal esquerda. Outros 12 indivíduos com TCs normais das adrenais apresentaram o cortisol sérico elevado durante o TSDexa (Tabela 15).

Tabela 15. Pacientes com TCs das adrenais normais, porém com o cortisol sérico elevado após o teste de supressão com 1 mg de dexametasona VO à meia-noite.

Indivíduo	Sexo	Idade (anos)	Valor do F sérico após 1º TSDexa (VR < 1,8 mcg/dL)	Valor do F sérico após 2º TSDexa (VR < 1,8 mcg/dL)	Valor da Dexa sérica durante 2º TSDexa (VR 180-550 ng/dL)	Valor do F sérico após supressão prolongada com Dexa (VR < 1,8 mcg/dL)	Valor do 1º F salivar à 0 h (VR ≤ 0,13 mcg/dL)	Valor do 2º F salivar à 0 h (VR ≤ 0,13 mcg/dL)	TC
III-15	F	89	2,5	2,9	151	#	<0,10	<0,10	Ad. D e E normais
III-20	F	84	4,0	5,1	457	3,1	0,25	#	Ad. D e E normais
III-36	M	85	2,4	2,1	370	#	<0,10	#	Ad. D e E normais
III-38	F	74	2,4	2,5	603	#	<0,10	#	Ad. D e E normais
III-39*	M	78	3,1	3,7	687	#	0,16	0,10	Ad. D e E normais
III-41	F	75	1,9	1,9	351	#	<0,10	#	Ad. D e E normais
III-42	M	73	2,2	4,3	251	#	0,10	<0,10	Ad. D e E normais
III-47	M	59	4,3	2,2	290	#	<0,10	<0,10	Ad. D e E normais
IV-14	M	51	1,8	2,3	118	#	<0,10	<0,10	Ad. D e E normais
IV-29	F	37	2,4	2,4	179	#	<0,10	<0,10	Ad. D e E normais
IV-31*	M	48	2,2	1,8	223	#	<0,10	<0,10	Ad. D e E normais
IV-53*	F	45	23,3	23	<20	#	<0,10	#	Ad. D e E normais

Em vermelho estão destacados os valores hormonais alterados. Idade (na época da avaliação); cortisol (F); teste de supressão com 1 mg de dexametasona via oral à meia-noite (TSDexa); valor de referência (VR); dexametasona (Dexa); tomografia computadorizada (TC); adrenal (Ad.); direita (D); esquerda (E). * Os pacientes III-39 e IV-31 apresentavam IRC e a paciente IV-53 fazia uso de dois anticonvulsivantes em doses elevadas.

Entre os pacientes da tabela anterior, quatro apresentavam um valor de dexametasona sérica inapropriado para a realização do teste de supressão (indivíduos III-15, IV-14, IV-29 e IV-53), dois apresentavam insuficiência renal crônica (indivíduos III-39 e IV-31), não havendo nenhum caso com hepatopatia. Dois desses pacientes (indivíduos III-20 e III-39) apresentavam ainda uma elevação do cortisol salivar à meia-noite, em pelo menos uma das dosagens. A paciente III-20 foi submetida a um teste prolongado de supressão com dexametasona (1 mg VO de 6/6 h por 48 h), ainda sim, não foi possível suprimir seu cortisol sérico para um valor inferior a 1,8 mcg/dL.

4.1.2 Achados radiológicos

Os principais achados radiológicos encontrados nas TCs dos pacientes com AIMAH familiar estão descritos na tabela seguinte (Tabela 16). O espessamento de ambas as adrenais associado à presença de nódulos bilaterais foi o achado radiológico mais frequente. No entanto, em um terço dos indivíduos (5/15) foi encontrada alteração radiológica em somente uma das adrenais, além disso, em alguns casos predominava o espessamento difuso da glândula e em outros, a presença de um ou mais nódulos (Figura 14).

Tabela 16. Principais achados radiológicos nas TCs das adrenais dos pacientes diagnosticados com AIMAH.

Indivíduo	Sexo	Idade (anos)	Número de nódulos	Tamanho do maior nódulo	Densidade do maior nódulo	Glândula adrenal alterada	Laudo final
III-29	F	74	Ad. E – 3 ou mais Ad. D – 2	Ad. E – 3,2 cm Ad. D – 5,0 cm	Ad. E – 19 UH Ad. D – 24 UH	ambas	Ad. E espessada com nódulos Ad. D espessada com nódulos
III-32	F	70	Ad. E – 3 ou mais Ad. D – 1	Ad. E – 3,8 cm Ad. D – 1,6 cm	Ad. E – 9,0 UH Ad. D – 5,0 UH	ambas	Ad. E espessada com nódulos Ad. D espessada com 1 nódulo
III-35	F	67	Ad. E – 1 Ad. D – 1	Ad. E – 1,3 cm Ad. D – 1,5 cm	Ad. E – 5 UH Ad. D – 17 UH	ambas	Ad. E espessada com 1 nódulo Ad. D com 1 nódulo
IV-4	M	59	Ad. E – 3 ou mais Ad. D – 3 ou mais	Ad. E – 3,2 cm Ad. D – 2,5 cm	Ad. E – 29 UH Ad. D – 13 UH	ambas	Ad. E espessada com nódulos Ad. D espessada com nódulos
IV-7	F	52	Ad. E – 3 ou mais Ad. D – 3 ou mais	Ad. E – 2,2 cm Ad. D – 2,6 cm	Ad. E – 16 UH Ad. D – 28 UH	ambas	Ad. E espessada com nódulos Ad. D espessada com nódulos
IV-9	F	55	Ad. E – 0 Ad. D – 1	Ad. E – Ad. D – 1,8 cm	Ad. E – Ad. D – 10 UH	adrenal D	Ad. E normal Ad. D com 1 nódulo
IV-10	M	54	Ad. E – 0 Ad. D – 1	Ad. E – Ad. D – 2,1 cm	Ad. E – Ad. D – 10 UH	adrenal D	Ad. E normal Ad. D com 1 nódulo
IV-13	F	53	Ad. E – 1 Ad. D – 1	Ad. E – 2,1 cm Ad. D – 1,4 cm	Ad. E – 22 UH Ad. D – 22 UH	ambas	Ad. E espessada com 1 nódulo Ad. D com 1 nódulo
IV-18	M	45	Ad. E – # Ad. D – #	Ad. E – # Ad. D – #	Ad. E – # Ad. D – #	ambas	Ad. E espessada com nódulos Ad. D espessada com nódulos
IV-30	M	49	Ad. E – 3 ou mais Ad. D – 2	Ad. E – 2,3 cm Ad. D – 2,2 cm	Ad. E – 8 UH Ad. D – 13 UH	ambas	Ad. E espessada com nódulos Ad. D espessada com nódulos
IV-32	M	46	Ad. E – 3 ou mais Ad. D – 0	Ad. E – 2,0 cm Ad. D –	Ad. E – 20 UH Ad. D –	adrenal E	Ad. E espessada com nódulos Ad. D normal
IV-33	M	45	Ad. E – 3 ou mais Ad. D – 2	Ad. E – 2,5 cm Ad. D – 2,4 cm	Ad. E – 10 UH Ad. D – 9 UH	ambas	Ad. E espessada com nódulos Ad. D espessada com nódulos
IV-36	M	39	Ad. E – 1 Ad. D – 1	Ad. E – 2,1 cm Ad. D – 1,3 cm	Ad. E – 16 UH Ad. D – 10 UH	ambas	Ad. E com 1 nódulo Ad. D com 1 nódulo
IV-48	M	52	Ad. E – 1 Ad. D – 0	Ad. E – 1,5 cm Ad. D –	Ad. E – 26 UH Ad. D –	adrenal E	Ad. E espessada com 1 nódulo Ad. D normal
V-6	F	32	Ad. E – 0 Ad. D – 2	Ad. E – Ad. D – 1,2 cm	Ad. E – Ad. D – 30 UH	adrenal D	Ad. E normal Ad. D espessada com nódulos

Tomografia computadorizada (TC); adrenal (Ad.); esquerda (E); direita (D); unidades Hounsfield (UH); # (dados não disponíveis). Todos os nódulos adrenais considerados nas descrições acima apresentavam diâmetro maior que 1 cm.

Figura 14. Achados radiológicos na AIMAH familiar. No indivíduo III-29, a presença de múltiplos nódulos bilaterais, sobressaindo do contorno glandular, era marcante. Já no indivíduo IV-13, predominava o espessamento difuso da adrenal esquerda (neste corte, não é possível observar bem a glândula adrenal direita, que apresentava um nódulo).

A densidade do maior nódulo de cada glândula adrenal variou de 8-30 UH. Cerca de 61% desses nódulos demonstravam uma densidade maior que 10 UH e 30% uma densidade maior que 20 UH. Não foi encontrada nenhuma relação entre o tamanho e a densidade dos nódulos. Indivíduos com nódulos maiores ou em maior número apresentavam um valor mais elevado do cortisol sérico durante o TSDexa (Figuras 15 e 16). Nódulos maiores também tendiam a ocorrer com mais frequência nos indivíduos com cortisol salivar elevado (Figura 17). Percebeu-se ainda que o tamanho médio dos nódulos adrenais era significativamente maior no grupo de pacientes com ACTH mais baixo (< 10 pg/dL) (Figura 18). Não foi observada nenhuma relação entre o tamanho dos nódulos e os valores séricos do SDHEA.

Figura 15. Nos pacientes com AIMAH familiar, foi encontrada uma forte correlação positiva entre o tamanho do maior nódulo adrenal e o valor do cortisol (F) sérico, durante o TSDexa; (coeficiente de correlação de *Pearson* = 0,831; $p < 0,001$).

Figura 16. Nos pacientes com AIMAH familiar, o valor médio do cortisol sérico, durante o TSDexa, foi significativamente mais alto no grupo de indivíduos com um número maior de nódulos adrenais (Grupo 2), em relação àqueles com menos nódulos (Grupo 1); (valor médio de 10,21 ± 7,5 mcg/dL e 3,06 ± 0,6 mcg/dL, respectivamente; $p = 0,045$; teste t de *Student*).

Figura 17. Nos pacientes com AIMAH familiar, o tamanho mediano dos nódulos adrenais (linha pontilhada) foi significativamente maior no grupo de indivíduos com o cortisol (F) salivar elevado (Grupo 2), em relação àqueles que apresentavam este último exame normal (Grupo 1); (tamanho mediano de 3,2 cm e 2,1 cm, respectivamente; $p = 0,024$; teste de *Wilcoxon-Mann-Whitney*).

Figura 18. Nos pacientes com AIMAH familiar, o tamanho médio dos nódulos adrenais foi significativamente maior no grupo de indivíduos com ACTH plasmático baixo (< 10 pg/dL) (Grupo 2), em relação àqueles com ACTH mais elevado (≥ 10 pg/dL) (Grupo1); (tamanho médio de $3,4 \pm 1,2$ cm e $2,0 \pm 0,7$ cm, respectivamente; $p = 0,041$; teste t de *Student*).

4.1.3 Pesquisa de receptores hormonais aberrantes nas adrenais

Os resultados dos testes *in vivo* para a pesquisa de receptores hormonais aberrantes encontram-se resumidos na tabela abaixo (Tabela 17).

Tabela 17. Resultados dos testes para a pesquisa de receptores hormonais aberrantes.

Ind.	Metoclopramida	Terlipressina	Glucagon	LHRH	TRH	Refeição	T. Postural	ACTH
III-29	+19%	#	#	#	#	#	#	#
III-32	+19%	+41%	+1%	+11%	+31%	+20%	+67%	+251%
IV-04	+14%	#	-10%	-12%	+43%	+12%	+22%	+166%
IV-07	+92%	+45%	-1%	-20%	+5%	-6%	+21%	+131%
IV-10	+41%	+102%	+3%	+7%	-11%	+14%	+64%	#
IV-13	+48%	#	#	#	#	#	#	#
IV-18	+67%	#	-6%	-3%	-2%	-5%	#	+205%
IV-30	-4%	+49%	-19%	+6%	+8%	0%	+102%	+335%
IV-32	-15%	+49%	-14%	-17%	+48%	-5%	+91%	+416%
V-06	+17%	+5,3%	+12%	-3%	+41%	+14%	+69%	+370%

O incremento do cortisol sérico $\geq 50\%$, em relação ao seu valor basal, está representando em vermelho e $\geq 25\%$ em azul. Indivíduo (Ind.); gonadorrelina (LHRH); hormônio liberador de tirotrofina (TRH); refeição mista (refeição); teste postural (T. postural); tetracosactida (ACTH sintético); e # valor não disponível.

Nem todos pacientes realizaram todos os estímulos hormonais e farmacológicos propostos, o que foi motivado, sobretudo, pela indisponibilidade de alguns pacientes em comparecer ao HCFMUSP por 4 dias seguidos. Ainda sim, os resultados foram muito informativos. Não se observou uniformidade na resposta aos diferentes estímulos *in vivo*, exceto ao ACTH sintético, ou seja, pacientes diferentes demonstraram respostas distintas a determinados secretogogos utilizados durante os testes. Embora a maioria dos pacientes tenha respondido ao teste postural (incremento do cortisol sérico $\geq 50\%$), dois indivíduos não o fizeram, inclusive o caso-índice da família (indivíduo IV-7). Além disso, a intensidade e a frequência das

respostas não estavam relacionadas com o tamanho e o número de nódulos adrenais ou com o grau de hipercortisolismo prévio de cada paciente.

4.1.4 Propedêutica de imagem para a investigação de meningiomas

Sete membros da família estudada (três do sexo masculino e quatro do sexo feminino) diagnosticados com AIMAH (indivíduos III-35, IV-7, IV-9, IV-18, IV-30, IV-32 e V-6) e outros oito casos da doença não pertencentes à família (todos do sexo feminino), acompanhados no Ambulatório de Suprarrenal do HCFMUSP, foram submetidos a uma RM de encéfalo para a investigação da presença de meningiomas no sistema nervoso central.

Inicialmente, constatou-se que a paciente IV-9, pertencente à família estudada, havia sido submetida à ressecção cirúrgica de um volumoso meningioma intracraniano aos 26 anos de idade. O exame anatomopatológico confirmou tratar-se de um meningioma angiomatoso. No caso específico dessa paciente, a ocorrência do meningioma antecedeu o diagnóstico da AIMAH em cerca de 20 anos, não sendo observadas alterações radiológicas sugestivas da recidiva do tumor no último exame de imagem. Outros dois membros da família (indivíduos IV-7 e IV-32) demonstraram na RM lesões extra-axiais sólidas, localizadas na topografia das meninges e que se realçavam intensamente pelo meio de contraste; alterações típicas dos meningiomas intracranianos. É interessante observar que a paciente IV-7 apresentava três lesões com as características supracitadas, em regiões extra-axiais diferentes, não contíguas.

Outras duas pacientes com AIMAH, não pertencentes à família estudada, também demonstraram na RM achados radiológicos típicos de meningiomas

intracranianos. Em uma dessas pacientes, foram também evidenciadas múltiplas lesões extra-axiais não contíguas na topografia meníngea; além disso, foi constatado que a irmã dessa paciente falecera anos antes, durante a ressecção cirúrgica de um volumoso meningioma intracraniano, segundo o atestado de óbito (Figura 19).

Figura 19. Ressonância magnética de duas pacientes com AIMAH demonstrando lesões intracranianas típicas de meningiomas, com a impregnação intensa e homogênea pelo meio de contraste (gadolínio). Paciente A (indivíduo IV-7 da família): presença de lesão mediana no plano esfenoidal com pequeno componente supraselar; lesão na alta convexidade; além de pequena lesão no forame magno à esquerda (não demonstrada acima). Paciente B (não pertencente à família estudada): presença de lesão implantada na linha média da fossa craniana anterior, que se estende superiormente na linha inter-hemisférica; espessamento e impregnação meníngeos difusos, estendendo-se para a fossa média e, posteriormente, em direção ao tentório; além de espessamento meníngeo da região infratentorial.

Dessa forma, foram encontradas imagens típicas de meningiomas intracranianos em um terço (5/15) dos pacientes com AIMAH (um paciente do sexo masculino e quatro do sexo feminino) submetidos ao exame de RM. A idade média dos pacientes ao diagnóstico dos meningiomas foi de $48,2 \pm 16,9$ anos (26-73). Dois desses pacientes demonstravam uma síndrome de Cushing manifesta, outros dois a forma subclínica da doença e em uma paciente, conforme comentado anteriormente, a ocorrência do meningioma antecedeu o diagnóstico da AIMAH. Considerando-se somente os indivíduos pertencentes à família estudada, submetidos ao exame de RM, é possível observar que 43% (3/7) deles apresentavam lesões compatíveis com meningiomas intracranianos. É importante destacar que os demais indivíduos diagnosticados com AIMAH também foram selecionados para a realização da RM, porém não puderam comparecer ao HCFMUSP para se submeterem ao exame de imagem proposto.

4.1.5 Exame de ^{18}F -FDG-PET/CT

Ao todo, cinco pacientes com AIMAH foram submetidos a um exame de ^{18}F -FDG-PET/CT para a investigação da atividade metabólica das adrenais hiperplasiadas. Três desses pacientes (indivíduos IV-7, IV-30 e IV-32) pertenciam à família estudada; a primeira apresentava uma síndrome de Cushing manifesta e os dois últimos, a forma subclínica da doença. Outras duas pacientes com síndrome de Cushing manifesta, não pertencentes à família estudada, também realizaram o exame de ^{18}F -FDG-PET/CT; uma apresentava AIMAH familiar e a outra, a forma esporádica da doença. Os principais achados do exame de ^{18}F -FDG-PET/CT encontram-se descritos na Tabela 18 e nas Figuras 20 e 21 (147).

Tabela 18. Principais achados do exame de ¹⁸F-FDG-PET/CT das adrenais.

Indivíduo	A	B (IV-7)	C	D (IV-30)	E (IV-32)
Idade (anos)	50	58	65	49	46
Sexo	F	F	F	M	M
Forma da AIMA	esporádica	familiar	familiar	familiar	familiar
Apresentação clínica da síndrome de Cushing	manifesta	manifesta	manifesta	subclínica	subclínica
TC das adrenais	Ad. D e E espessadas com nódulos	Ad. D e E espessadas com nódulos	Ad. D e E espessadas com nódulos	Ad. D e E espessadas com nódulos	Ad. E espessada com nódulos
Captção de ¹⁸ F-FDG pela adrenal (SUVmax)	Ad. D – 5,5 Ad. E – 3,5	Ad. D – 5,6 Ad. E – 4,6	Ad. D – 5,2 Ad. E – 4,9	Ad. D – 4,7 Ad. E – 4,3	Ad. D – * Ad. E – 4,0
Captção de ¹⁸ F-FDG pela adrenal em relação ao fígado	Ad. D ↑ Ad. E ↔	Ad. D ↑ Ad. E ↑	Ad. D ↑ Ad. E ↑	Ad. D ↑ Ad. E ↑	Ad. D ↓ Ad. E ↔
Relação SUVmax adrenal / SUVmax hepática	Ad. D – 1,8 Ad. E – 1,1	Ad. D – 2,4 Ad. E – 2,0	Ad. D – 2,0 Ad. E – 1,9	Ad. D – 1,2 Ad. E – 1,1	Ad. D – * Ad. E – 1,1

Os achados destacados em vermelho são típicos dos carcinomas adrenocorticais e das metástases adrenais: SUVmax > 3,1 (39); captação adrenal de ¹⁸F-FDG aumentada em relação à captação do fígado (avaliação subjetiva) (40); e relação SUVmax da adrenal/SUVmax hepática ≥ 1,8 (42). Feminino (F); masculino (M); tomografia computadorizada (TC); adrenal (Ad.); direita (D); esquerda (E); fluorodesoxiglicose marcada (¹⁸F-FDG); valor padrão de captação máxima (SUVmax); aumentada (↑); semelhante (↔); e diminuída (↓).

Figura 20. Imagens de ^{18}F -FDG-PET/CT das três pacientes com AIMAH e síndrome de Cushing manifesta (indivíduos A, B e C). Observou-se um aumento da captação da ^{18}F -FDG pelas adrenais hiperplasiadas; o valor padrão de captação máxima (SUVmax) das adrenais (setas) encontrava-se elevado, conforme comentado na tabela anterior. Extraído de Alencar *et al.* (147).

Figura 21. Imagens de ^{18}F -FDG-PET/CT dos dois pacientes com AIMAH e síndrome de Cushing subclínica (indivíduos D e E). De modo geral, observou-se um aumento da captação da ^{18}F -FDG pelas adrenais hiperplasiadas (setas grandes); alguns nódulos, no entanto, não demonstraram uma captação aumentada do radiotraçador, como pode ser observado na asa lateral da adrenal esquerda do indivíduo E (seta pequena).

A captação da ^{18}F -FDG no exame PET/CT encontrava-se elevada nos pacientes com AIMAH. Na maioria dos nódulos adrenais hiperplasiados foi demonstrado um perfil de captação da ^{18}F -FDG que, habitualmente, é encontrado em metástases e carcinomas adrenais: valor padrão de captação máxima (SUVmax) > 3,1 (39); atividade aumentada da ^{18}F -FDG em relação ao fígado (avaliação subjetiva) (40); e relação SUVmax da adrenal / SUVmax hepática $\geq 1,8$ (42). A captação aumentada da ^{18}F -FDG na AIMAH foi demonstrada nas formas familiar e esporádica da doença, tanto nos pacientes com síndrome de Cushing manifesta como subclínica. Entretanto, nos indivíduos com a forma subclínica da doença, a captação da ^{18}F -FDG não foi homogênea, nesses casos, alguns nódulos adrenais não evidenciaram uma atividade metabólica aumentada.

4.2 Estudo molecular

4.2.1 Sequenciamento do *MC2R* e estudo de ligação genética utilizando microssatélites

O sequenciamento da região codificadora do gene *MC2R* foi realizado, utilizando-se o DNA genômico do caso-índice da família; porém, não foram encontradas mutações ou mesmo variantes alélicas. Na sequência, foi conduzido o estudo de ligação genética, utilizando-se microssatélites localizados próximos aos seguintes genes: *MC2R*, *PRKARIA*, *GNAS*, *MEN1*, *APC* e *FH*. Observou-se que os microssatélites selecionados não segregavam junto com doença na família, o que fala contra a participação dos genes supracitados na etiopatogênese da AIMAH familiar, pelo menos na genealogia estudada (Figuras 22-27).

Figura 22. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites próximos ao gene *MC2R*. Foi observado que os microssatélites não segregavam com a doença em toda a genealogia. Neste estudo, foi utilizado DNA genômico dos indivíduos III-11, III-14, III-27, III-29, III-32, IV-1, IV-3, IV-4, IV-7, IV-13, IV-18, IV-30, IV-32, IV-33 e IV-36 (vide Figura 10 para a identificação dos indivíduos selecionados). Gene do receptor do ACTH (*MC2R*).

Figura 23. Estudo de ligação genética utilizando microsatélites próximos ao gene *PRKARIA*. Observou-se que os microsatélites não segregavam com a doença na genealogia. Foi identificada uma possível recombinação dos marcadores em pelo menos dois indivíduos (*crossing-over*). Neste estudo, foi utilizado DNA genômico dos indivíduos III-11, III-14, III-27, III-29, III-32, IV-1, IV-3, IV-4, IV-7, IV-13, IV-18, IV-30, IV-32, IV-33 e IV-36 (vide Figura 10 para a identificação dos indivíduos selecionados). Gene da subunidade reguladora tipo 1A da proteína cinase A (*PRKARIA*).

Figura 24. Estudo de ligação genética utilizando microsatélites próximos ao gene *GNAS*. Embora se possa sugerir uma tendência à segregação em um dos segmentos da genealogia, isso não foi observado nos demais. Foi identificada uma possível recombinação dos marcadores em pelo menos um indivíduo (*crossing-over*). Neste estudo, foi utilizado DNA genômico dos indivíduos III-11, III-14, III-27, III-29, III-32, IV-1, IV-4, IV-7, IV-13, IV-18 e IV-30 (vide Figura 10 para a identificação dos indivíduos selecionados). Gene da subunidade alfa da proteína Gs (*GNAS*).

Figura 25. Estudo de ligação genética utilizando um microsatélite próximo ao gene *MEN1*. Observou-se que o microsatélite não segregava com a doença na genealogia. Neste estudo, foi utilizado DNA genômico dos indivíduos III-11, III-14, III-27, III-29, III-32, IV-1, IV-4, IV-7, IV-13, IV-18 (vide Figura 10 para a identificação dos indivíduos selecionados). Gene da neoplasia endócrina múltipla do tipo 1 (*MEN1*).

Figura 26. Estudo de ligação genética utilizando microsatélites próximos ao gene *APC*. Os microsatélites não segregaram com a doença na genealogia. Neste estudo, foi utilizado DNA genômico dos indivíduos III-11, III-14, III-14, III-27, III-32, IV-1, IV-4, IV-7, IV-18 (vide Figura 10 para a identificação dos indivíduos selecionados). Gene da polipose adenomatosa familiar (*APC*).

Figura 27. Estudo de ligação genética utilizando microsatélites próximos ao gene *FH*. Observou-se que os microsatélites não segregavam com a doença na genealogia. Neste estudo, foi utilizado DNA genômico dos indivíduos III-11, III-14, III-27, III-29, III-32, IV-1, IV-3, IV-4, IV-7, IV-13, IV-18, IV-30, IV-32, IV-33 e IV-36 (vide Figura 10 para a identificação dos indivíduos). Gene da fumarato hidratase (*FH*).

4.2.2 Estudo de ligação genética em escala genômica utilizando SNPs

Ao todo, 24 membros da família integraram o estudo de ligação genética em escala genômica utilizando SNPs, sendo 15 casos (indivíduos III-29, III-32, III-35, IV-4, IV-7, IV-9, IV-10, IV-13, IV-18, IV-30, IV-32, IV-33, IV-36, IV-48 e V-6) e nove controles com idade superior a 60 anos (III-1, III-14, III-27, III-37, III-40, III-46, IV-1, IV-3 e IV-41) (vide Figura 10 e Anexo A). A genotipagem dos SNPs e a análise de bioinformática foram realizadas no Laboratório *Prognomix*, em Montreal/QC, no Canadá, em colaboração com um grupo de pesquisa chefiado pelo Dr. André Lacroix.

Ao término dos experimentos, antes de iniciar a análise de bioinformática propriamente dita, foi avaliada a qualidade da genotipagem. Comprovou-se por meio do algoritmo *Birdseed Version 2* e de modelos matemáticos que o número de SNPs genotipados (*quality control call rate*) e que a capacidade de discriminação de cada SNP (*contrast quality control*) estavam adequados (Tabela 19 e Figura 28). Além disso, os SNPs que integraram a análise de bioinformática não demonstravam inconsistências mendelianas ou relacionadas ao sexo e apresentavam uma taxa de heterozigosidade adequada.

Uma vez confirmada a qualidade da genotipagem, foi realizada a análise de *linkage* com diferentes ferramentas de bioinformática disponibilizadas pelo programa SAGE (*Statistical Analysis for Genetic Epidemiology*) (141). Utilizando-se os métodos não paramétricos SIBPAL e LODPAL e o método paramétrico LODLINK, foram calculados o *LOD score* e/ou p-valor de cada SNP genotipado (Tabelas 20, 21 e 22; Anexos B, C e D).

Tabela 19. Avaliação da qualidade da genotipagem dos SNPs.

Indivíduo	Condição clínica	QC call rate	Contrast QC
III-29	AIMAH	99,01%	3,08
III-32	AIMAH	98,83%	2,59
III-35	AIMAH	99,26%	3,58
IV-04	AIMAH	98,58%	2,82
IV-07	AIMAH	98,95%	2,72
IV-09	AIMAH	99,14%	3,33
IV-10	AIMAH	98,71%	2,98
IV-13	AIMAH	98,64%	2,51
IV-18	AIMAH	98,80%	2,77
IV-30	AIMAH	98,95%	2,91
IV-32	AIMAH	99,14%	2,57
IV-33	AIMAH	97,69%	2,54
IV-36	AIMAH	99,45%	3,15
IV-48	AIMAH	98,34%	2,12
V-06	AIMAH	98,03%	2,14
III-01	Controle	97,97%	2,24
III-14	Controle	98,52%	2,44
III-27	Controle	99,08%	2,85
III-37	Controle	98,46%	1,79
III-40	Controle	98,83%	2,43
III-46	Controle	99,14%	2,46
IV-01	Controle	98,27%	1,87
IV-03	Controle	98,58%	2,53
IV-41	Controle	99,32%	2,57

Os valores acima confirmaram o êxito do processo de genotipagem. O *quality control call rate* permitiu avaliar a porcentagem de SNPs genotipados (valor de referência > 86%); e o *contrast quality control* avaliou a capacidade de se discriminar cada alelo (SNP) (valor de referência > 0,4). *Quality control* (QC).

Figura 28. Histograma da densidade do logaritmo da intensidade dos *arrays*. Foram sobrepostos os histogramas de todos os pacientes, demonstrando a homogeneidade na intensidade (fluorescência) de cada *array* (A) e na contrastação de cada alelo (B), fundamental para a discriminação de cada SNP.

Tabela 20. Resultados obtidos com o SIBPAL (método não paramétrico). Estão representados os 50 SNPs com menor p-valor.

SNP	LOD score	p-valor	Cromossomo	Localização*
rs11866053	#	$1,10 \times 10^{-9}$	16	q13
rs16958674	#	$1,10 \times 10^{-9}$	16	q13
rs1216526	#	$1,51 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs1145423	#	$1,51 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs1785883	#	$1,51 \times 10^{-7}$	11	q22.3
rs10459005	#	$1,60 \times 10^{-7}$	11	q22.3
rs11225869	#	$1,60 \times 10^{-7}$	11	q22.3
rs7938241	#	$1,60 \times 10^{-7}$	11	q22.3
rs11224853	#	$1,70 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs4503499	#	$1,70 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs11224889	#	$1,70 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs2513195	#	$1,70 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs947991	#	$1,70 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs11225329	#	$1,74 \times 10^{-7}$	11	q22.2
rs595030	#	$1,87 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs607890	#	$1,87 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs1144128	#	$1,96 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs17649831	#	$2,05 \times 10^{-7}$	11	q22.3
rs12276707	#	$2,06 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs601727	#	$2,20 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs11604982	#	$2,30 \times 10^{-7}$	11	q22.3
rs12798695	#	$2,30 \times 10^{-7}$	11	q22.3
rs10502124	#	$2,55 \times 10^{-7}$	11	q23.1
rs1469629	#	$2,55 \times 10^{-7}$	11	q23.1
rs12283094	#	$2,65 \times 10^{-7}$	11	q22.2
rs317522	#	$2,94 \times 10^{-7}$	11	q23.1
rs12931204	#	$1,19 \times 10^{-5}$	16	q21
rs11075565	#	$1,19 \times 10^{-5}$	16	q21
rs12446448	#	$1,19 \times 10^{-5}$	16	q21
rs1364086	#	$1,19 \times 10^{-5}$	16	q21
rs4785833	#	$2,69 \times 10^{-5}$	16	q21
rs27848	#	$2,91 \times 10^{-5}$	16	q21
rs1069572	#	$3,00 \times 10^{-5}$	16	q21
rs153677	#	$3,00 \times 10^{-5}$	16	q21
rs12470275	#	$3,21 \times 10^{-5}$	2	q24.3
rs523332	#	$3,49 \times 10^{-5}$	11	q22.1
rs500760	#	$4,41 \times 10^{-5}$	11	q22.1
rs511298	#	$4,41 \times 10^{-5}$	11	q22.1
rs572580	#	$4,41 \times 10^{-5}$	11	q22.1
rs684129	#	$4,79 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs670418	#	$4,79 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs170487	#	$4,79 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs226109	#	$5,18 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs106224	#	$5,18 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs226108	#	$5,18 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs226101	#	$5,18 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs2432703	#	$5,18 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs604148	#	$5,18 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs687607	#	$5,18 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs183442	#	$5,18 \times 10^{-5}$	11	q23.1

*O genoma de referência para a delimitação da localização foi o NCBI36/hg18. # (dado não disponível).

Tabela 21. Resultados obtidos com o LODPAL (método não paramétrico). Estão representados os 50 SNPs com maior *LOD score* e menor p-valor.

SNP	<i>LOD score</i>	p-valor	Cromossomo	Localização*
rs3180467	21,504414	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q13
rs11645934	21,504414	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q13
rs11640445	21,502398	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q21
rs16961721	21,502398	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q21
rs8044976	21,502398	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q21
rs7777346	21,454655	$< 1 \times 10^{-15}$	7	q11.23
rs419828	21,453297	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q13
rs4582461	21,421601	$< 1 \times 10^{-15}$	7	p22.1
rs11978979	21,414469	$< 1 \times 10^{-15}$	7	p22.2
rs11639585	21,380893	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q21
rs10941020	21,367617	$< 1 \times 10^{-15}$	5	p13.3
rs675990	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs427032	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs2880486	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs16973746	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs13332653	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs4787325	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs980125	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs13380789	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs8044950	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs711210	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs12930392	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs8048370	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs8058648	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs4583240	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs11639647	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs11640776	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs1437110	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs152671	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs27795	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs2287996	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs27806	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs11862457	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs1342280	21,085492	$< 1 \times 10^{-15}$	10	q21.1
rs1418367	21,085492	$< 1 \times 10^{-15}$	10	q21.1
rs7091768	21,072527	$< 1 \times 10^{-15}$	10	q21.1
rs12412557	21,072527	$< 1 \times 10^{-15}$	10	q21.1
rs10825316	21,057458	$< 1 \times 10^{-15}$	10	q21.1
rs1753336	20,612831	$< 1 \times 10^{-15}$	10	p12.1
rs10517422	20,262138	$< 1 \times 10^{-15}$	4	p14
rs1871480	20,262138	$< 1 \times 10^{-15}$	4	p14
rs1479756	20,262138	$< 1 \times 10^{-15}$	4	p14
rs2973216	20,262138	$< 1 \times 10^{-15}$	4	p14
rs2973215	20,262138	$< 1 \times 10^{-15}$	4	p14
rs2973214	20,262138	$< 1 \times 10^{-15}$	4	p14
rs11724784	20,262138	$< 1 \times 10^{-15}$	4	p14
rs11727634	20,262138	$< 1 \times 10^{-15}$	4	p14
rs7206828	20,172155	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p11.2
rs1104549	20,172155	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p11.2
rs1528317	20,172155	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p11.2

*O genoma de referência para a delimitação da localização foi o NCBI36/hg18.

Tabela 22. Resultados obtidos com o LODLINK (método paramétrico). Estão representados os 50 SNPs com maior *LOD score* e menor p-valor.

SNP	<i>LOD score</i>	p-valor	Cromossomo	Localização*
rs1648390	3,05	$8,88 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs4252591	3,00	$1,01 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs10502152	3,00	$1,01 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs10891301	3,00	$1,01 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs12225443	3,00	$1,01 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs10789855	3,00	$1,01 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs2303436	3,00	$1,01 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs6589259	3,00	$1,01 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs7951615	2,77	$1,77 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs12785570	2,77	$1,77 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs1529330	2,71	$2,08 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs10789856	2,71	$2,08 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs10812	2,71	$2,08 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs4467393	2,68	$2,22 \times 10^{-4}$	3	q29
rs510358	2,66	$2,32 \times 10^{-4}$	11	q23.2
rs12051352	2,63	$2,48 \times 10^{-4}$	16	q21
rs2880828	2,62	$2,59 \times 10^{-4}$	16	q21
rs4365524	2,61	$2,64 \times 10^{-4}$	20	q13.12
rs4937656	2,59	$2,74 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs11214320	2,59	$2,74 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs609076	2,57	$2,94 \times 10^{-4}$	11	q23.2
rs12418084	2,55	$3,05 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs11214036	2,55	$3,08 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs4785889	2,54	$3,10 \times 10^{-4}$	16	q21
rs13335969	2,54	$3,10 \times 10^{-4}$	16	q21
rs7206695	2,53	$3,20 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs2076074	2,52	$3,27 \times 10^{-4}$	1	q24.2
rs17616245	2,52	$3,30 \times 10^{-4}$	16	q21
rs1308841	2,52	$3,31 \times 10^{-4}$	16	q21
rs255205	2,52	$3,31 \times 10^{-4}$	16	q21
rs255204	2,52	$3,31 \times 10^{-4}$	16	q21
rs16969837	2,52	$3,31 \times 10^{-4}$	16	q21
rs10431920	2,52	$3,31 \times 10^{-4}$	16	q21
rs23840	2,52	$3,31 \times 10^{-4}$	16	q21
rs2526717	2,52	$3,31 \times 10^{-4}$	16	q21
rs11075616	2,51	$3,34 \times 10^{-4}$	16	q21
rs12800322	2,51	$3,38 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs1870496	2,51	$3,38 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs7566044	2,49	$3,51 \times 10^{-4}$	2	q31.1
rs3815574	2,49	$3,51 \times 10^{-4}$	2	q31.1
rs2302698	2,49	$3,51 \times 10^{-4}$	2	q31.1
rs10020695	2,49	$3,54 \times 10^{-4}$	4	q33
rs1784786	2,49	$3,55 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs10891288	2,49	$3,55 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs10891268	2,49	$3,57 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs7930326	2,49	$3,57 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs4936462	2,49	$3,57 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs949126	2,49	$3,57 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs255199	2,49	$3,58 \times 10^{-4}$	16	q21
rs7206660	2,49	$3,58 \times 10^{-4}$	16	q21

*O genoma de referência para a delimitação da localização foi o NCBI36/hg18.

Como pode ser observado (Tabelas 20, 21 e 22; Anexos B, C e D), vários SNPs alcançaram um *LOD score* elevado e/ou um p-valor baixo, após a análise de *linkage* com as diferentes ferramentas de bioinformática. Conforme mencionado anteriormente, os estudos de ligação genética utilizando *arrays* com uma densidade muito alta de SNPs têm encontrado *LOD scores* muito elevados e p-valores muito baixos em vários loci, tornando inviável a utilização dos pontos de corte anteriormente propostos para a definição da presença ou não de *linkage* (143). A estratégia adotada, então, foi investigar se uma mesma região específica do genoma fora considerada suspeita por mais de uma ferramenta de bioinformática (Anexos B, C e D). Desta forma, foram delimitadas regiões genômicas nos cromossomos 16 (16p12.1, 16p11.2, 16q12.1, 16q13 e 16q21) e 11 (11q23.1) (genoma de referência NCBI36/hg18), potencialmente relacionadas à etiologia genética da AIMAH familiar. Foi observado que os dois SNPs com menor p-valor pelo método SIPBAL (rs11866053 e rs16958674) e os dois SNPs com maior *LOD score* pelo método LODPAL (rs3180467 e rs11645934) delimitavam exatamente a mesma região do genoma. Todos os quatro marcadores (SNPs) estavam localizados dentro do locus do gene do receptor 56 acoplado à proteína G (*GPR56*). Essa foi também a única região do genoma delimitada com grande proximidade pelas três metodologias, uma vez que, pelo método LODLINK, os SNPs rs11866053 e rs16958674 demonstravam um *LOD score* de 2,2 (p-valor $< 1 \times 10^{-3}$). Dois outros aspectos ainda chamaram a atenção para esse locus, a demonstração anterior do aumento da expressão do *GPR56* na AIMAH e a importância desse gene para a integridade da membrana basal da pia-mater, a mais interna das três meninges (106, 148). Diante de tais evidências, foi realizado o sequenciamento da região codificadora do *GPR56* e de dois outros genes

próximos, o *GPR97* e o *GPR114*. Esses dois últimos genes também estão hiperexpressos na AIMAH, embora o papel desempenhado por ambos ainda não tenha sido definido (109).

Após realizar o sequenciamento das regiões codificadoras dos genes *GPR56*, *GPR97* e *GPR114* em dois membros da família com a doença (indivíduos IV-7 e IV-18), não foram encontradas mutações. As variantes alélicas (SNPs) observadas não segregavam com a AIMAH dentro da genealogia, estando também presentes em um membro da família sem a doença (indivíduo III-11) (Tabela 23). É importante lembrar que os SNPs rs11866053, rs16958674, rs3180467 e rs11645934, que delimitaram essa região do genoma durante o estudo de *linkage*, estão localizados em uma região não codificadora do gene *GPR56* e, desta forma, não foram novamente genotipados durante o sequenciamento do gene.

Tabela 23. Variantes alélicas encontradas nas regiões codificadoras e nas regiões de transição íntron-éxon dos genes *GPR56*, *GPR97* e *GPR114*.

Gene	Cromossomo	Variante alélica	SNP	Posição	Indivíduos
<i>GPR56</i>	16	g.57687314T>C (homozigose)	rs2305307	íntron (entre éxons 4 e 5)	III-11, IV-7 e IV 18
<i>GPR56</i>	16	g.57689385C>G (homozigose)	rs1801257	éxon 6	III-11, IV-7 e IV 18
<i>GPR56</i>	16	g.57689805A>C (heterozigose)	rs1801255	éxon 7	III-11, IV-7 e IV 18
<i>GPR56</i>	16	g.57689883T>C (homozigose)	rs1376041	éxon 7	III-11, IV-7 e IV 18
<i>GPR56</i>	16	g.57691265C>A (homozigose)	rs2305309	éxon 10	III-11, IV-7 e IV 18
<i>GPR56</i>	16	g.57695568C>T (homozigose)	rs17240890	íntron (entre éxons 12 e 13)	III-11, IV-7 e IV 18
<i>GPR56</i>	16	g.57695604C>T (heterozigose)	rs2290177	íntron (entre éxons 12 e 13)	III-11, IV-7 e IV 18
<i>GPR56</i>	16	g.57697532T>G (homozigose)	rs10852554	éxon 14	III-11, IV-7 e IV 18
<i>GPR56</i>	16	g.57697568C>A (homozigose)	rs10852555	éxon 14	III-11, IV-7 e IV 18
<i>GPR97</i>	16	g.57707249C>T (heterozigose)	rs73552781	éxon 2	III-11
<i>GPR97</i>	16	g.57710093C>G (homozigose)	rs12596635	íntron (entre éxons 2 e 3)	III-11, IV-7 e IV 18
<i>GPR97</i>	16	g.57713250C>T (heterozigose)	rs4238795	íntron (entre éxons 4 e 5)	III-11
<i>GPR97</i>	16	g.57713679C>A (heterozigose)	rs9935751	íntron (entre éxons 5 e 6)	III-11
<i>GPR97</i>	16	g.57713685A>C (heterozigose)	rs9925879	íntron (entre éxons 5 e 6)	III-11
<i>GPR97</i>	16	g.57722328C>T (heterozigose)	rs12444859	éxon 12	III-11
<i>GPR114</i>	16	g.57595999A>G (heterozigose)	rs1004363	éxon 2	III-11, IV-7 e IV 18

Foi realizado o sequenciamento dos genes *GPR56*, *GPR97* e *GPR114* em dois pacientes com AIMAH (indivíduos IV-7 e IV-18) e em um membro da família sem a doença (indivíduo III-11). Genoma de referência GRCh37.p5.

Em uma outra estratégia utilizada, investigou-se também se havia algum SNP com *LOD score* elevado e/ou p-valor baixo próximo a genes candidatos. Um total de 35 genes foram selecionados, em função do papel que desempenham e da potencial relação dos mesmos com a fisiopatologia da AIMAH e dos meningiomas (Tabela 24) (31, 50, 51, 79, 84, 89, 95, 102, 107, 149-154). No entanto, não foi encontrado nenhum SNP com *LOD score* ou p-valor significativos a uma distância menor que 500 mil bp dos genes suspeitos selecionados. Definiu-se empiricamente como significativo o p-valor que englobava os 50 principais SNPs determinados por cada método (SIBPAL, p-valor $< 1 \times 10^{-4}$; LODPAL, p-valor $< 1 \times 10^{-15}$; e LODLINK, p-valor $< 1 \times 10^{-3}$) (Anexos B, C e D).

Tabela 24. Genes candidatos. Avaliou-se se algum SNP com *LOD score* elevado e/ou p-valor baixo encontrava-se próximo a um dos genes abaixo.

Genes candidatos (síndrome genéticas associadas)		Posição
Genes anteriormente associados à AIMAH ou potencialmente relacionados à doença	GNAS - <i>GNAS complex locus (McCune-Albright syndrome)</i> (84)	20q13.2
	MEN1 - <i>Menin (Multiple endocrine neoplasia, type 1)</i> (89)	11q13.1
	APC - <i>Adenomatous polyposis coli (Familial adenomatous polyposis 1)</i> (95)	5q22.2
	FH - <i>Fumarate hydratase (Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer)</i> (102)	1q43
	MC2R - <i>Melanocortin 2 receptor (Familial glucocorticoid deficiency 1)</i> (79)	18p11.21
	MRAP - <i>Melanocortin 2 receptor accessory protein (Familial glucocorticoid deficiency 2)</i> (50)	21q22.11
	MRAP2 - <i>Melanocortin 2 receptor accessory protein 2</i> (51)	6q14.3
	PRKARIA - <i>Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha (Pigmented nodular adrenocortical disease, primary, 1)</i> (107)	17q24.2
	PDE11A - <i>Phosphodiesterase 11A (Pigmented nodular adrenocortical disease, primary, 2)</i> (149)	2q31.2
	NF2 - <i>Neurofibromin 2 (Neurofibromatosis, type II)</i> (31)	22q12.2
	P53 - <i>Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome 1)</i> (31)	17p13.1
	MNI - <i>Meningioma 1 gene</i> (31)	22q12.1
Genes anteriormente associados à ocorrência de meningiomas ou potencialmente relacionados a esses tumores	DAL1 (EPB41L3) - <i>Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3</i> (31)	18p11.31
	BAM22 (APIB1) - <i>Adaptor-related protein complex 1, beta-1 subunit</i> (31)	22q12.2
	PTEN1 - <i>Phosphatase and tensin homolog (Cowden disease)</i> (31)	10q23.31
	PTCH1 - <i>Patched, drosophila, homolog of, 1 (Gorlin syndrome)</i> (31)	9q22.32
	PTCH2 - <i>Patched, drosophila, homolog of, 2 (Gorlin syndrome)</i> (31)	1p34.1
	SUFU - <i>Suppressor of fused, drosophila, homolog of (Gorlin syndrome)</i> (31)	10q24.32
	CHEK2 - <i>Checkpoint kinase 2, s. pombe, homolog of (Li-Fraumeni syndrome 2)</i> (31)	22q12.1
	MSH2 - <i>MutS, E. coli, homolog of, 2 (Turcot syndrome)</i> (31)	2p21
	MSH6 - <i>MutS, E. coli, homolog of, 6 (Turcot syndrome)</i> (31)	2p16.3
	MLH1 - <i>MutL, E. coli, homolog of, 1 (Turcot syndrome)</i> (31)	3p22.2
	PMS2 - <i>Postmeiotic segregation increased, S. cerevisiae, 2 (Turcot syndrome)</i> (31)	7p22.1
	VHL - <i>VHL gene (Von Hippel-Lindau syndrome)</i> (31)	3p25.3
	CCND1 - <i>Cyclin D1 (Von Hippel-Lindau syndrome)</i> (31)	11q13.3
	NF1 - <i>Neurofibromin 1 (Neurofibromatosis, type I)</i> (150)	17q11.2
	CREBBP - <i>Creb-binding protein (Rubinstein-Taybi syndrome 1)</i> (150)	16p13.3
	RECQL2 - <i>Recq protein-like 2 (Werner syndrome)</i> (150)	8p12
	CDKN2A - <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2a (Melanoma-astrocytoma syndrome)</i> (150)	9p21.3
	SMARCB1 - <i>SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1</i> (151)	22q11.23
	SMARCE1 - <i>SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1</i> (152)	17q21.2
	SMO - <i>Smoothed, drosophila, homolog of</i> (153)	7q32.1
	AKT1 - <i>V-AKT murine thymoma viral oncogene homolog 1</i> (153)	14q32.33
	TRAF7 - <i>Ring finger and WD repeat domains-containing protein 1</i> (154)	16p13.3
	KLF4 - <i>Kruppel-like factor 4</i> (154)	9q31.2

5 Discussão

5.1 Achados clínicos, laboratoriais e radiológicos

Até o momento, foram descritas na literatura 14 genealogias com AIMAH familiar, no entanto, nenhuma demonstrou ser muito informativa (8-19). No presente estudo, foi realizada uma avaliação sistemática e minuciosa da maior família já descrita com AIMAH, o que propiciou a melhor compreensão dos aspectos clínicos, laboratoriais e radiológicos da doença e tornou viável a posterior realização do estudo molecular (Tabela 25).

Tabela 25. Famílias já descritas com AIMAH.

Famílias	Número de indivíduos com AIMAH em cada família	Sexo	Referência
1	2	2 ♀	<i>Findlay et al.</i> , 1993 (8)
2	2	2 ♂	<i>Oheda et al.</i> , 1995 (9)
3	4	2 ♀ e 2 ♂	<i>Minami et al.</i> , 1996 (10)
4	3	1 ♀ e 2 ♂	<i>Someya et al.</i> , 1996 (11)
5	2	1 ♀ e 1 ♂	<i>Imöhl et al.</i> , 2002 (12)
6	2	1 ♀ e 1 ♂	<i>Miyamura et al.</i> , 2002 (13)
7	7	6 ♀ e 1 ♂	<i>Nies et al.</i> , 2002 (14)
8	2	2 ♀	<i>Lee et al.</i> , 2005 (15)
9	2	2 ♀	<i>Watson et al.</i> , 2007 (16)
10	4	2 ♀ e 2 ♂	<i>Vezzosi et al.</i> , 2007 (17)
11	10	6 ♀ e 4 ♂	<i>Bourdeau et al.</i> , 2007 (19)
12	3	3 ♂	<i>Gagliardi et al.</i> , 2009 (18)
13	2	2 ♂	<i>Gagliardi et al.</i> , 2009 (18)
14	3	1 ♀ e 2 ♂	<i>Gagliardi et al.</i> , 2009 (18)
15	15	7 ♀ e 8 ♂	Presente estudo
Total de indivíduos = 63		33 (52%) ♀ e 30 (48%) ♂	

Na genealogia estudada, a AIMAH foi aparentemente herdada de forma autossômica dominante. A doença acometia uma proporção semelhante de homens e

mulheres, estava presente em três gerações consecutivas, podia ser herdada tanto do sexo masculino (pai) como do feminino (mãe) e afetava cerca de 50% dos irmãos em alguns segmentos da família. Além disso, na genealogia não havia relatos de casamentos consanguíneos. Em outras famílias menores, anteriormente descritas, já se suspeitava que a AIMAH familiar tivesse um padrão de herança autossômico dominante, os achados deste trabalho vieram corroborar esta hipótese (17, 18). Analisando-se a genealogia, percebeu-se ainda que a doença fora herdada da família materna do caso-índice. A presença de um tio paterno (indivíduo III-3) de 80 anos de idade, com um nódulo de 1 cm na adrenal, não invalida esta hipótese. Trata-se, provavelmente, neste caso, de um incidentaloma adrenal, cuja prevalência nesta faixa etária é de cerca de 7% (155).

Um aspecto importante observado durante propedêutica laboratorial dos pacientes com AIMAH familiar foi a baixa sensibilidade do cortisol salivar à meia-noite (sensibilidade = 21%) e do cortisol urinário (sensibilidade = 14%) para o diagnóstico da doença em sua fase inicial. Observou-se que ambos os testes somente tendiam a se alterar em fases mais avançadas da doença, quando o cortisol sérico no TSDexa já se encontrava mais elevado. No caso específico do cortisol salivar, percebeu-se também que somente os pacientes com nódulos adrenais maiores tendiam a apresentá-lo alterado. A sensibilidade do cortisol salivar à meia-noite para o diagnóstico da SC subclínica tem sido recentemente questionada por outros autores. Masserini *et al.* (156) encontraram uma sensibilidade de 22,7% do cortisol salivar à meia-noite para o diagnóstico da SC subclínica (método imunofluorimétrico) e Palmieri *et al.* (157) uma sensibilidade de 31,3% (dosagem por cromatografia líquida e espectrometria de massa em tandem). Desta forma, a

baixa sensibilidade do cortisol salivar à meia-noite no diagnóstico da SC subclínica parece independe do método analítico empregado. No presente estudo, a coleta da saliva dos pacientes diagnosticados com AIMAH foi acompanhada diretamente pelo examinador, em pelo menos uma oportunidade, afastando-se a possibilidade de coleta, manipulação ou armazenamento incorretos das amostras. A baixa sensibilidade do cortisol urinário no diagnóstico da AIMAH familiar já fora anteriormente documentada no diagnóstico dos casos esporádicos da doença, em sua fase inicial (7). Em 64% dos pacientes diagnosticados com AIMAH familiar (9/14), a coleta da urina de 24 horas ocorreu durante um período de internação no HCFMUSP. Os cinco pacientes (indivíduos III-29, IV-9, IV-13, IV-33 e IV-36) que colheram a urina fora do ambiente hospitalar foram previamente orientados e, posteriormente, negaram problemas relacionados à coleta, como o extravio de parte da urina, por exemplo. Duas críticas podem ser feitas em relação à dosagem do cortisol urinário realizada neste estudo. Primeiramente, nem todos os pacientes repetiram a coleta da urina em uma segunda oportunidade, conforme sugerido na literatura. Além disso, por questões logísticas, não foi possível realizar a dosagem da creatinina urinária dos pacientes que tiveram a urina coletada fora do ambiente hospitalar (2). Ainda que levássemos em consideração somente os pacientes que coletaram a urina internados no HCFMUSP, a sensibilidade do cortisol urinário para o diagnóstico da AIMAH familiar seria muito baixa (sensibilidade de 22%). Metodologias mais modernas para dosagem do cortisol urinário que as utilizadas neste estudo, como o emprego da cromatografia líquida e espectrometria de massa em tandem, têm melhorado a especificidade deste teste no diagnóstico da SC, mas não sua sensibilidade (2). Desta forma, a baixa sensibilidade do cortisol urinário demonstrada neste trabalho não pode

ser atribuída aos métodos de dosagem empregados. Assim, sustento que o TSDexa deve ser a propedêutica laboratorial de escolha para a investigação inicial de um paciente suspeito de apresentar AIMAH familiar.

Apesar da AIMAH determinar um quadro clínico de SC ACTH independente, em somente 46% dos pacientes com a doença (5/11) o ACTH plasmático encontrava-se abaixo de 10 pg/mL. Foi demonstrado também que os pacientes com o ACTH plasmático < 10 pg/mL apresentavam nódulos adrenais maiores e um cortisol sérico significativamente mais elevado durante TSDexa. A supressão do ACTH plasmático ocorreu principalmente nas fases mais avançadas da AIMAH familiar, desta forma, valores normais desse hormônio não permitem excluir o diagnóstico da doença, sobretudo, em suas fases iniciais. Em conformidade com os achados deste trabalho, já fora anteriormente documentado que, na AIMAH associada à SC subclínica, o ACTH plasmático pode estar somente parcialmente supresso (23).

Nenhum paciente com AIMAH familiar demonstrou hiperandrogenismo clínico ou laboratorial. A síntese androgênica adrenal tendia a estar diminuída na doença, possivelmente, em decorrência da inibição, ainda que parcial, do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal. Percebeu-se que os valores séricos do SDHEA estavam baixos em 62% dos pacientes com AIMAH familiar (8/13) e próximos do limite inferior da normalidade nos demais casos da doença. Valores baixos do SDHEA foram documentados com frequência, tanto nos pacientes com nódulos adrenais maiores como naqueles com nódulos menores, corroborando a ideia de que os valores desse hormônio tendem a se reduzir já na fase inicial da doença. Na literatura, são muito raros os relatos de aumento da síntese androgênica na AIMAH

(30), sendo assim, um valor baixo do SDHEA sérico pode ser considerado um indício relativamente precoce da SC subclínica associada à doença.

Neste estudo, demonstrou-se que a avaliação sistemática dos indivíduos pertencentes à uma genealogia com AIMAH familiar pode permitir o diagnóstico de um grande número de casos insuspeitos da doença. Cerca de 86% dos pacientes diagnosticados com AIMAH na família (12/14) apresentavam uma SC subclínica, caracterizada pela escassez de sinais e sintomas relacionados ao hipercortisolismo, pela ausência da supressão normal do cortisol sérico durante o TSDexa e pelo valor normal do cortisol urinário. Esse achado reforça a suspeita mais recente de que a SC subclínica seja a forma mais frequente de manifestação da AIMAH (7).

Na genealogia estudada, três achados clínicos estavam associados à maior probabilidade da ocorrência da doença, a presença de pletora, o diagnóstico de DM ou pré-DM e o relato de ganho ponderal progressivo nos últimos 5 anos. No entanto, 27% dos pacientes diagnosticados com AIMAH (4/15) não apresentavam nenhum desses achados. De fato, a investigação indistinta de toda a família foi essencial para o diagnóstico dos pacientes. Desta forma, nenhuma característica clínica ou comorbidade parece delimitar com segurança quais são os pacientes que devem ser avaliados dentro de uma genealogia com AIMAH familiar.

Fundamentado no que foi exposto acima, é possível presumir que alguns pacientes definidos como portadores da forma esporádica da AIMAH apresentem, de fato, a forma familiar da doença. Assim, diante do diagnóstico de um paciente com AIMAH (forma familiar ou esporádica), proponho que seus parentes de primeiro grau também sejam avaliados para a presença da doença. É possível que a avaliação laboratorial preliminar desses indivíduos, mediante a dosagem do cortisol sérico

durante o TSDexa, permita o diagnóstico de um grande número de casos insuspeitos da doença, sobretudo, a partir da quarta década de vida.

Entre os pacientes com a propedêutica laboratorial discordante da TC, chama a atenção o caso específico do indivíduo III-20 (Tabela 15). Essa paciente não apresentava comorbidades (ex. obesidade, alcoolismo, doenças psiquiátricas, entre outras), nem fazia uso de qualquer medicação e apresentava uma TC normal das adrenais. Ainda sim, a paciente demonstrou um cortisol salivar aumentado e um cortisol sérico elevado durante o TSDexa, a despeito do valor sérico adequado da medicação. Foi também observado que, mesmo após um teste de supressão prolongado com a dexametasona, os valores séricos do cortisol ainda permaneciam elevados. Embora não tenha sido possível complementar a propedêutica laboratorial da paciente, não há como descartar a possibilidade de que a AIMAH também possa manifestar-se de uma forma frustra, mesmo em uma idade mais avançada. Os pacientes III-39 e IV-31 (Tabela 15) também demonstraram um cortisol sérico inapropriadamente elevado durante o TSDexa. Ambos apresentavam insuficiência renal crônica. Tem sido proposto que esta última condição clínica poderia levar a um aumento da meia-vida do cortisol e, conseqüentemente, determinaria resultados falso-positivos durante o TSDexa (158). Já nos indivíduos III-36, III-38, III-41, III-42 e III-47 (Tabela 15), a discordância entre a propedêutica laboratorial e radiológica ainda precisa ser elucidada.

São poucos os trabalhos na literatura que abordam de forma específica os aspectos radiológicos da AIMAH (36-38). No presente estudo, o achado radiológico encontrado com maior frequência nas TCs dos pacientes com AIMAH familiar foi o espessamento de ambas as adrenais, associado à presença de nódulos bilaterais, em

conformidade ao que já fora anteriormente descrito (7). Em alguns casos predominava o espessamento difuso da glândula e, em outros, a formação dos nódulos. Em um terço dos pacientes (5/15), somente uma das adrenais demonstrava alteração radiológica. Desta forma, a assimetria entre as glândulas pode ser um achado radiológico frequente na doença, devendo ser levado em consideração para a interpretação correta do exame de imagem. Foi observado também que o coeficiente de atenuação dos nódulos na AIMAH familiar era, com frequência, maior do que o demonstrado pelos adenomas adrenais (habitualmente ≤ 10 UH) (159). Cerca de 61% dos nódulos adrenais na AIMAH tinham uma densidade maior que 10 UH e 30% uma densidade maior que 20 UH. Não está claro o motivo pelo qual alguns nódulos apresentavam uma densidade mais elevada, não sendo observada nenhuma relação entre o tamanho dos nódulos e o coeficiente de atenuação dos mesmos.

5.2 Papel dos receptores hormonais aberrantes na AIMAH familiar

Durante os testes *in vivo* para a pesquisa de receptores hormonais aberrantes, não foi demonstrada uniformidade nas respostas dos pacientes, aos diferentes estímulos hormonais e farmacológicos. Foi observado que pacientes diferentes apresentavam respostas distintas a determinados secretogogos utilizados durante os testes. Ainda que a maioria dos pacientes tenha respondido ao teste postural (incremento do cortisol sérico $\geq 50\%$), dois indivíduos não o fizeram, inclusive, o caso-índice da família (indivíduo IV-7). Além disso, a intensidade e a frequência das respostas não estavam relacionadas com o grau de hipercortisolismo prévio, com o tamanho dos nódulos adrenais ou com o número de nódulos. Partindo-se do pressuposto de que os receptores hormonais aberrantes teriam um papel primordial

para o início e progressão da AIMA, como defendem alguns autores, seria esperado que os indivíduos doentes, pertencentes a uma mesma família, respondessem aos mesmos estímulos hormonais e farmacológicos, inclusive, em uma fase precoce da doença (54). Assim, a heterogeneidade dos resultados dos testes na família fala mais a favor da hipótese de que a expressão dos receptores aberrantes seja um epifenômeno do processo fisiopatológico, resultante da proliferação e desdiferenciação celular. Em algumas das famílias anteriormente diagnosticadas com AIMA, foi relatada uma homogeneidade na resposta aos diferentes estímulos hormonais, durante os testes *in vivo* (7, 22). No entanto, uma vez que essas famílias eram pequenas, frequentemente, somente dois indivíduos foram avaliados durante os testes. Além disso, na grande maioria das vezes, somente parte dos estímulos foram realizados (13, 15). Em uma outra família com três indivíduos testados, os resultados dos testes *in vivo* também não foram concordantes, embora o título do trabalho deixe transparecer a ideia oposta (18).

5.3 Associação entre AIMA e meningiomas intracranianos

Imagens típicas de meningiomas intracranianos foram encontradas em um terço (5/15) dos pacientes com AIMA submetidos ao exame de RM. Levando-se em consideração somente os indivíduos com AIMA pertencentes à família estudada, 43% (3/7) deles apresentavam lesões compatíveis com esse tumor. É importante lembrar que a incidência anual de meningiomas na população geral é de somente 4,5 casos para cada 100 mil indivíduos. Além disso, a partir dos 45 anos de idade, esses tumores são diagnosticados de maneira incidental em 0,9% dos exames de RM de encéfalo, uma prevalência 37 vezes menor que a demonstrada nos

pacientes com AIMAH (31, 160). Esses últimos dados vem reforçar a hipótese de que a associação das duas entidades não se deu ao acaso. Duas observações falam a favor de uma predisposição genética para o desenvolvimento de meningiomas na AIMAH. Primeiramente, em duas pacientes foram demonstradas múltiplas lesões intracranianas compatíveis com esses tumores. Além disso, em uma outra paciente, o meningioma fora diagnosticado em uma idade bem precoce (26 anos). Vale a pena lembrar que, na população geral, esses tumores ocorrem sobretudo a partir da sétima década de vida (31). Nenhuma relação foi encontrada entre a ocorrência dos meningiomas e a intensidade do hipercortisolismo; 40% dos pacientes com estes tumores (2/5) apresentavam uma síndrome de Cushing subclínica e, no caso específico da paciente IV-9, o meningioma ocorrera, muito provavelmente, antes do desenvolvimento da AIMAH. Somente uma paciente tivera sua lesão intracraniana ressecada cirurgicamente, e o exame anatomopatológico confirmou tratar-se de um meningioma angiomatoso, um tipo histológico incomum. Correspondendo a somente 2,1% desses tumores, o meningioma angiomatoso demonstra um rico componente vascular e, habitualmente, um comportamento benigno (161). Já fora anteriormente descrita a ocorrência desse tipo específico de meningioma em algumas famílias. No entanto, nesses indivíduos, não foi possível definir a causa genética dos meningiomas, nem foi investigada a presença de AIMAH (162, 163). Durante o estudo de ligação genética em escala genômica utilizando SNPs, não foram encontrados marcadores (SNPs) com um *LOD score* ou p-valor significativos, próximos aos genes potencialmente relacionados à ocorrência dos meningiomas. É provável que um outro gene esteja relacionado à AIMAH e à ocorrência desses tumores na família estudada. Fundamentado nos achados supracitados, propõe-se que

diante do diagnóstico de um caso de AIMAH, seja realizado um exame de RM para a investigação da presença de meningiomas intracranianos. A título de curiosidade, é interessante lembrar que a síndrome de Cushing e os meningiomas foram duas das principais entidades clínicas estudadas por Harvey Cushing em vida e, agora, após cerca de 80 anos, propõe-se uma possível associação entre ambas (1, 164, 165).

5.4 Padrão de captação da ^{18}F -FDG no exame de PET/CT

O exame de ^{18}F -FDG-PET/CT permite avaliar concomitantemente a anatomia da adrenal e sua atividade metabólica. Recentemente, alguns trabalhos têm sugerido que esse exame possa ser útil na diferenciação das lesões adrenais malignas e benignas (39, 40). Normalmente, as lesões adrenais malignas possuem um alto metabolismo glicolítico e, conseqüentemente, uma maior captação de ^{18}F -FDG. Desta forma, o valor padrão de captação máxima (SUVmax), parâmetro utilizado para quantificar a captação da ^{18}F -FDG, costuma estar mais elevado nos carcinomas e nas metástases adrenais que nos adenomas da glândula (41). Metser *et al.* (39) defendem a utilização do SUVmax para a diferenciação das lesões adrenais malignas (SUVmax $> 3,1$) e benignas (SUVmax $\leq 3,1$). Boland *et al.* (40) já sugerem uma avaliação subjetiva da captação da ^{18}F -FDG pela lesão adrenal. Segundo esses autores, as lesões adrenais malignas demonstrariam uma atividade de ^{18}F -FDG aumentada em relação ao fígado, o que permitiria diferenciá-las das lesões benignas. Tessonnier *et al.* (42), por sua vez, propõem a utilização da razão SUVmax da lesão / SUVmax do fígado para a diferenciação das lesões adrenais. De acordo com eles, uma relação $\geq 1,8$, indicaria a presença de uma lesão adrenal maligna, com uma sensibilidade e especificidade de 100%.

O presente estudo demonstrou que na AIMAH as adrenais podem captar a ^{18}F -FDG de forma semelhante às lesões adrenais malignas (metástases e carcinomas). Na maioria dos nódulos adrenais hiperplasiados, demonstrou-se: um valor padrão de captação máxima (SUV_{max}) $> 3,1$, uma atividade aumentada da ^{18}F -FDG em relação ao fígado (avaliação subjetiva) e uma relação SUV_{max} da lesão / SUV_{max} hepática $\geq 1,8$. Essa captação aumentada da ^{18}F -FDG na AIMAH foi demonstrada nas formas familiar e esporádica da doença, tanto nos pacientes com síndrome de Cushing manifesta como subclínica. Nos indivíduos com a forma subclínica da doença, no entanto, a captação não foi homogênea, já que nesses pacientes, nem todos os nódulos adrenais exibiam uma atividade aumentada da ^{18}F -FDG.

O mecanismo que explicaria a maior atividade metabólica dos nódulos adrenais na AIMAH, uma doença benigna, ainda não é compreendido. Já fora demonstrado que o aumento do tamanho dos nódulos na AIMAH está associado à ativação de vias de sinalização geralmente relacionadas à carcinogênese adrenal (113). É possível que a ativação de algumas dessas vias de sinalização esteja associada à captação aumentada da ^{18}F -FDG. Essa hipótese é condizente com a atividade metabólica diminuída de alguns nódulos adrenais pequenos, encontrados nas fases iniciais da AIMAH. Uma outra hipótese para justificar o aumento da atividade metabólica dos nódulos é a ativação da via de sinalização dos fatores de transcrição induzidos por hipóxia (HIFs), já relacionada à AIMAH (100, 101, 104, 112). A ativação dessa via está associada ao aumento da atividade glicolítica e à indução da expressão da proteína transportadora de glicose 1 (GLUT-1) (101). A expressão aumentada dessa proteína é um dos mecanismos responsáveis pelo

aumento da captação da ^{18}F -FDG em vários tumores, inclusive, no carcinoma adrenocortical (166, 167). Essas hipóteses, no entanto, ainda precisam ser avaliadas.

Outro ponto relevante, ainda a ser esclarecido, é se haveria uma relação entre a maior atividade metabólica do nódulo adrenal e o aumento da esteroidogênese. Já fora anteriormente proposto para o tratamento da AIMAH a ressecção preferencial da adrenal que apresentasse uma maior captação de iodo-131-6 β -iodometil-19-norcolesterol à cintilografia (121). Por um raciocínio análogo, seria interessante avaliar se a ressecção preferencial do tecido adrenal metabolicamente mais ativo possibilitaria o controle do hipercortisolismo e a preservação de parte da função adrenal, tornando desnecessária a reposição crônica de glicocorticoides.

5.5 Estudo molecular

Com o objetivo de se mapear regiões cromossômicas e loci potencialmente relacionados à etiologia genética da AIMAH, foram utilizadas, neste estudo, diferentes técnicas de biologia molecular. Inicialmente, foi definida uma lista de genes candidatos, potencialmente associados à AIMAH familiar. Em seguida, os mesmos foram investigados por sequenciamento direto (gene *MC2R*), por meio de um estudo de ligação genética utilizando microsatélites específicos e em um estudo de ligação genética em escala genômica utilizando SNPs. Os resultados desses estudos demonstraram ser improvável a participação dos genes candidatos avaliados na etiopatogênese da AIMAH, permitindo supor que um outro gene seria o responsável pela doença na família.

Na etapa seguinte do estudo molecular, buscou-se por regiões do genoma compartilhadas pelos indivíduos doentes com uma frequência maior do que a

esperada. Assim, por meio de um estudo de ligação genética em escala genômica utilizando SNPs, investigou-se quais eram os marcadores (SNPs) que cossegregavam com a doença ao longo das gerações, delimitando-se regiões genômicas potencialmente associadas à AIMAH. Uma vez que se utilizou de um array com uma altíssima densidade de SNPs, durante a análise de bioinformática, foram encontrados valores de *LOD score* muito elevados e p-valores muito baixos em vários loci. Esse achado inviabilizou a utilização dos pontos de corte inicialmente propostos na literatura, para a definição da presença ou não de *linkage* (140, 142). As dificuldades encontradas nesta etapa da análise de bioinformática também foram relatadas por outros autores em estudos semelhantes (143). Os programas de bioinformática utilizados nos estudos de *linkage* foram elaborados em uma época em que não se dispunha de *arrays* com uma densidade tão alta de marcadores. A disponibilidade de um número muito grande de SNPs determinou o aumento da sensibilidade e a redução da especificidade dessa técnica de biologia molecular. Diante de tais achados, adotou-se a seguinte estratégia, investigou-se inicialmente quais eram as regiões do genoma definidas como suspeitas por mais de um método de análise. Assim, um mesmo loci considerado suspeito pelas três ferramentas de bioinformática utilizadas (SIBPAL, LODPAL e LODLINK) foi analisado prioritariamente. Foi observado que as três ferramentas de bioinformática delimitavam na região 16q13 do genoma (genoma de referência NCBI36/hg18) uma pequena área correspondente ao locus do gene do receptor 56 acoplado à proteína G (*GPR56*). Essa área era delimitada com grande proximidade pelos três métodos de análise, além disso, continha os dois SNPs mais significativos, tanto pelo programa SIBPAL como pelo LODPAL. Outros aspectos também reforçavam a suspeita sobre esse locus, tais

como: a demonstração anterior do aumento da expressão do *GPR56* na AIMAH (106); a importância desse gene para a integridade da membrana basal da pia-mater, a mais interna das três meninges (148, 168); a associação anterior do gene com a proliferação celular e tumorigênese (169); e sua capacidade de ativar a via de sinalização da β -catenina (170). Ou seja, era um gene que poderia se enquadrar perfeitamente, tanto na fisiopatologia da AIMAH como dos meningiomas. Desta forma, foi realizado o sequenciamento do gene *GPR56* e de dois outros genes localizados nessa mesma região, o *GPR97* e o *GPR114*. Já fora demonstrado que esses dois últimos genes também estão hiperexpressos na AIMAH, embora ainda se desconheça o papel desempenhado pelos mesmos (109). Apesar das evidências a favor desses genes, não foram encontradas mutações nas regiões codificadoras do *GPR56*, *GPR97* e *GPR114*, após o sequenciamento dos mesmos. Além disso, as variantes alélicas (SNPs) encontradas não segregavam com a AIMAH na genealogia estudada.

Além da região genômica 16q13, onde estão localizados os genes acima, foram delimitadas no estudo *linkage* outras regiões suspeitas no cromossomo 16 (16p12.1, 16p11.2, 16q12.1 e 16q21) e no cromossomo 11 (11q23.1) (Anexos B, C e D). Essas regiões do genoma foram consideradas suspeitas por, pelo menos, duas ferramentas de bioinformática diferentes e contêm vários genes potencialmente relacionados à etiologia genética da doença. No presente momento, em um outro estudo, está sendo realizado o sequenciamento completo do exoma (*exome sequencing*) de 10 membros da família. Posteriormente, as informações disponibilizadas pelas duas técnicas de biologia molecular (*linkage* e *exome sequencing*) serão avaliadas de forma integrada. Nessa estratégia, em busca do gene

responsável pela doença, serão analisadas prioritariamente as variantes alélicas encontradas no *exome sequencing* que estejam localizadas nas regiões genômicas definidas como suspeitas pelo estudo de linkage.

6 Conclusões

6.1 Aspectos clínicos

- Na família estudada, o padrão de transmissão da AIMAH foi autossômico dominante, e a SC subclínica foi a forma mais frequente de manifestação da doença.
- Nenhuma característica clínica ou comorbidade permitiu definir, com segurança, os indivíduos da família que deveriam ser avaliados para a presença da doença. Desta forma, diante do diagnóstico de um paciente com AIMAH, é importante que todos os seus parentes de primeiro grau também sejam avaliados para a presença da doença, sobretudo, a partir da quarta década de vida.
- O teste de supressão com 1 mg de dexametasona via oral à meia-noite demonstrou ser o exame laboratorial de escolha para a avaliação inicial de um paciente suspeito de apresentar AIMAH familiar. Nesse teste, um valor do cortisol sérico $\geq 1,8$ mcg/dL foi sugestivo da presença da doença.
- As dosagens do cortisol salivar à meia-noite e do cortisol em urina de 24 horas demonstraram baixa sensibilidade para o diagnóstico precoce da AIMAH familiar e não devem ser utilizados isoladamente na avaliação inicial de um paciente suspeito de apresentar a doença.
- O ACTH plasmático somente demonstrou estar supresso nas fases mais tardias da AIMAH familiar; desta forma, valores normais desse hormônio (≥ 10 pg/dL) não permitem excluir a presença da doença.
- Valores baixos do SDHEA sérico demonstraram ser um indício relativamente precoce da síndrome de Cushing subclínica associada à AIMAH familiar.

- O achado radiológico mais frequente nas TCs dos pacientes com AIMAH familiar foi o espessamento de ambas as glândulas adrenais, associado à presença de nódulos bilaterais. O espessamento difuso das adrenais sem a distinção de nódulos e a presença de alterações radiológicas em somente uma das glândulas também foram observados com frequência. Assim, a possibilidade de achados radiológicos distintos na AIMAH familiar deve ser levada em consideração, para a interpretação correta dos exames de imagem.
- O coeficiente de atenuação dos nódulos adrenais na AIMAH familiar foi, frequentemente, maior do que o demonstrado pelos adenomas da glândula.
- Os resultados dos testes *in vivo* para a pesquisa de receptores hormonais aberrantes, conduzidos nos membros da família estudada, foram mais condizentes com a hipótese de que a expressão desses receptores seja um epifenômeno do processo fisiopatológico, resultante da proliferação e desdiferenciação celular.
- Uma alta prevalência de meningiomas intracranianos foi demonstrada nos pacientes com AIMAH, tanto na forma familiar como esporádica da doença. Assim, diante do diagnóstico de um paciente AIMAH, propõe-se que este seja submetido a um exame de RM de encéfalo, para a investigação do tumor.
- Pela primeira vez, demonstrou-se que as adrenais na AIMAH podem apresentar uma captação aumentada de ^{18}F -FDG no exame de PET/CT, de forma semelhante às metástases e aos carcinomas da glândula. Assim, a AIMAH deve

ser levada em consideração no diagnóstico diferencial das lesões adrenais que exibem uma atividade aumentada de ^{18}F -FDG.

6.2 Aspectos moleculares

- Nenhum dos 35 genes candidatos avaliados demonstrou estar potencialmente relacionado à etiopatogênese da AIMAH, na família estudada.
- As principais regiões do genoma suspeitas de estarem ligadas à etiologia genética da AIMAH familiar foram delimitadas no cromossomo 16 (16p12.1, 16p11.2, 16q12.1, 16q13 e 16q21) e no cromossomo 11 (11q23.1) (genoma de referência NCBI36/hg18).
- Não foram encontradas mutações nas regiões codificadoras dos genes *GPR56*, *GPR97* e *GPR114*, localizados no cromossomo 16 (16q13). Desta forma, estes genes não parecem estar relacionados à etiologia genética da doença em questão.

7 Anexos

Anexo A. Heredograma da família com AIMAH (figura ampliada).

Anexo B. Resultados obtidos com o método não paramétrico SIBPAL (SNPs com menor p-valor) (continuação).

SNP	LOD score	p-valor	Cromossomo	Localização*
rs11866053	#	$1,10 \times 10^{-9}$	16	q13
rs16958674	#	$1,10 \times 10^{-9}$	16	q13
rs1216526	#	$1,51 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs1145423	#	$1,51 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs1785883	#	$1,51 \times 10^{-7}$	11	q22.3
rs10459005	#	$1,60 \times 10^{-7}$	11	q22.3
rs11225869	#	$1,60 \times 10^{-7}$	11	q22.3
rs7938241	#	$1,60 \times 10^{-7}$	11	q22.3
rs11224853	#	$1,70 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs4503499	#	$1,70 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs11224889	#	$1,70 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs2513195	#	$1,70 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs947991	#	$1,70 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs11225329	#	$1,74 \times 10^{-7}$	11	q22.2
rs595030	#	$1,87 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs607890	#	$1,87 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs1144128	#	$1,96 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs17649831	#	$2,05 \times 10^{-7}$	11	q22.3
rs12276707	#	$2,06 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs601727	#	$2,20 \times 10^{-7}$	11	q22.1
rs11604982	#	$2,30 \times 10^{-7}$	11	q22.3
rs12798695	#	$2,30 \times 10^{-7}$	11	q22.3
rs10502124	#	$2,55 \times 10^{-7}$	11	q23.1
rs1469629	#	$2,55 \times 10^{-7}$	11	q23.1
rs12283094	#	$2,65 \times 10^{-7}$	11	q22.2
rs317522	#	$2,94 \times 10^{-7}$	11	q23.1
rs12931204	#	$1,19 \times 10^{-5}$	16	q21
rs11075565	#	$1,19 \times 10^{-5}$	16	q21
rs12446448	#	$1,19 \times 10^{-5}$	16	q21
rs1364086	#	$1,19 \times 10^{-5}$	16	q21
rs4785833	#	$2,69 \times 10^{-5}$	16	q21
rs27848	#	$2,91 \times 10^{-5}$	16	q21
rs1069572	#	$3,00 \times 10^{-5}$	16	q21
rs153677	#	$3,00 \times 10^{-5}$	16	q21
rs12470275	#	$3,21 \times 10^{-5}$	2	q24.3
rs523332	#	$3,49 \times 10^{-5}$	11	q22.1
rs500760	#	$4,41 \times 10^{-5}$	11	q22.1
rs511298	#	$4,41 \times 10^{-5}$	11	q22.1
rs572580	#	$4,41 \times 10^{-5}$	11	q22.1
rs684129	#	$4,79 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs670418	#	$4,79 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs170487	#	$4,79 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs226109	#	$5,18 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs106224	#	$5,18 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs226108	#	$5,18 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs226101	#	$5,18 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs2432703	#	$5,18 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs604148	#	$5,18 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs687607	#	$5,18 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs183442	#	$5,18 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs226165	#	$5,18 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs226163	#	$5,18 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs226154	#	$5,18 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs226153	#	$5,18 \times 10^{-5}$	11	q23.1

continua...

Anexo B. Resultados obtidos com o método não paramétrico SIBPAL (SNPs com menor p-valor) (conclusão).

SNP	<i>LOD score</i>	p-valor	Cromossomo	Localização *
rs226151	#	5,18 x 10 ⁻⁵	11	q23.1
rs120434	#	5,18 x 10 ⁻⁵	11	q23.1
rs120435	#	5,18 x 10 ⁻⁵	11	q23.1
rs516895	#	7,37 x 10 ⁻⁵	11	q22.1
rs574434	#	7,37 x 10 ⁻⁵	11	q22.1
rs8051414	#	9,49 x 10 ⁻⁵	16	p11.2
rs7194733	#	9,49 x 10 ⁻⁵	16	p11.2
rs7186121	#	9,49 x 10 ⁻⁵	16	p11.2
rs7197877	#	9,49 x 10 ⁻⁵	16	p11.2

Neste anexo (Anexo B) foram listados todos os SNPs com p-valor $< 1 \times 10^{-4}$, incluindo os 50 SNPs com menor p-valor. Em negrito estão destacadas as regiões genômicas consideradas suspeitas por mais de um método de bioinformática. *O genoma de referência para a delimitação da localização foi NCBI36/hg18. # (dado não disponível).

Anexo C. Resultados obtidos com o método não paramétrico LODPAL (SNPs com maior *LOD score* e menor p-valor) (continuação).

SNP	<i>LOD score</i>	p-valor	Cromossomo	Localização*
rs3180467	21,504414	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q13
rs11645934	21,504414	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q13
rs11640445	21,502398	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q21
rs16961721	21,502398	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q21
rs8044976	21,502398	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q21
rs7777346	21,454655	$< 1 \times 10^{-15}$	7	q11.23
rs419828	21,453297	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q13
rs4582461	21,421601	$< 1 \times 10^{-15}$	7	p22.1
rs11978979	21,414469	$< 1 \times 10^{-15}$	7	p22.2
rs11639585	21,380893	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q21
rs10941020	21,367617	$< 1 \times 10^{-15}$	5	p13.3
rs675990	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs427032	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs2880486	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs16973746	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs13332653	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs4787325	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs980125	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs13380789	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs8044950	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs711210	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs12930392	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs8048370	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs8058648	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs4583240	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs11639647	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p12.1
rs11640776	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs1437110	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs152671	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs27795	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs2287996	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs27806	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs11862457	21,099819	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs1342280	21,085492	$< 1 \times 10^{-15}$	10	q21.1
rs1418367	21,085492	$< 1 \times 10^{-15}$	10	q21.1
rs7091768	21,072527	$< 1 \times 10^{-15}$	10	q21.1
rs12412557	21,072527	$< 1 \times 10^{-15}$	10	q21.1
rs10825316	21,057458	$< 1 \times 10^{-15}$	10	q21.1
rs1753336	20,612831	$< 1 \times 10^{-15}$	10	p12.1
rs10517422	20,262138	$< 1 \times 10^{-15}$	4	p14
rs1871480	20,262138	$< 1 \times 10^{-15}$	4	p14
rs1479756	20,262138	$< 1 \times 10^{-15}$	4	p14
rs2973216	20,262138	$< 1 \times 10^{-15}$	4	p14
rs2973215	20,262138	$< 1 \times 10^{-15}$	4	p14
rs2973214	20,262138	$< 1 \times 10^{-15}$	4	p14
rs11724784	20,262138	$< 1 \times 10^{-15}$	4	p14
rs11727634	20,262138	$< 1 \times 10^{-15}$	4	p14
rs7206828	20,172155	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p11.2
rs1104549	20,172155	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p11.2
rs1528317	20,172155	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p11.2
rs7197963	20,172155	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p11.2
rs7359491	20,172155	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p11.2
rs2214139	20,172155	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p11.2
rs12921028	20,172155	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p11.2

continua...

Anexo C. Resultados obtidos com o método não paramétrico LODPAL (SNPs com maior *LOD score* e menor p-valor) (conclusão).

SNP	<i>LOD score</i>	p-valor	Cromossomo	Localização *
rs2359223	20,172155	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p11.2
rs6565284	20,172155	$< 1 \times 10^{-15}$	16	p11.2
rs1420588	19,715722	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs244099	19,619408	$< 1 \times 10^{-15}$	20	q13.12
rs986330	19,123336	$< 1 \times 10^{-15}$	15	q12
rs4887810	19,011375	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q23.1
rs4261573	19,011375	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q23.1
rs2908922	18,728037	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs2967249	18,728037	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs2967246	18,728037	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs1861563	18,728037	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs2024478	18,728037	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs2967283	18,728037	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs1510987	18,728037	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs2967292	18,728037	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs1355380	18,728037	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs1510981	18,728037	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs1543957	18,728037	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs11649147	18,728037	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs1533108	18,728037	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs10852591	18,728037	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1
rs8063808	18,728037	$< 1 \times 10^{-15}$	16	q12.1

Neste anexo (Anexo C) foram listados todos os SNPs com p-valor $< 1 \times 10^{-15}$, incluindo os 50 SNPs com menor p-valor. Em negrito estão destacadas as regiões genômicas consideradas suspeitas por mais de um método de bioinformática. *O genoma de referência para a delimitação da localização foi NCBI36/hg18.

Anexo D. Resultados obtidos com o método paramétrico LODLINK (SNPs com maior *LOD score* e menor p-valor) (continuação).

SNP	<i>LOD score</i>	p-valor	Cromossomo	Localização*
rs1648390	3,05	$8,88 \times 10^{-5}$	11	q23.1
rs4252591	3,00	$1,01 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs10502152	3,00	$1,01 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs10891301	3,00	$1,01 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs12225443	3,00	$1,01 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs10789855	3,00	$1,01 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs2303436	3,00	$1,01 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs6589259	3,00	$1,01 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs7951615	2,77	$1,77 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs12785570	2,77	$1,77 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs1529330	2,71	$2,08 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs10789856	2,71	$2,08 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs10812	2,71	$2,08 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs4467393	2,68	$2,22 \times 10^{-4}$	3	q29
rs510358	2,66	$2,32 \times 10^{-4}$	11	q23.2
rs12051352	2,63	$2,48 \times 10^{-4}$	16	q21
rs2880828	2,62	$2,59 \times 10^{-4}$	16	q21
rs4365524	2,61	$2,64 \times 10^{-4}$	20	q13.12
rs4937656	2,59	$2,74 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs11214320	2,59	$2,74 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs609076	2,57	$2,94 \times 10^{-4}$	11	q23.2
rs12418084	2,55	$3,05 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs11214036	2,55	$3,08 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs4785889	2,54	$3,10 \times 10^{-4}$	16	q21
rs13335969	2,54	$3,10 \times 10^{-4}$	16	q21
rs7206695	2,53	$3,20 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs2076074	2,52	$3,27 \times 10^{-4}$	1	q24.2
rs17616245	2,52	$3,30 \times 10^{-4}$	16	q21
rs1308841	2,52	$3,31 \times 10^{-4}$	16	q21
rs255205	2,52	$3,31 \times 10^{-4}$	16	q21
rs255204	2,52	$3,31 \times 10^{-4}$	16	q21
rs16969837	2,52	$3,31 \times 10^{-4}$	16	q21
rs10431920	2,52	$3,31 \times 10^{-4}$	16	q21
rs23840	2,52	$3,31 \times 10^{-4}$	16	q21
rs2526717	2,52	$3,31 \times 10^{-4}$	16	q21
rs11075616	2,51	$3,34 \times 10^{-4}$	16	q21
rs12800322	2,51	$3,38 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs1870496	2,51	$3,38 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs7566044	2,49	$3,51 \times 10^{-4}$	2	q31.1
rs3815574	2,49	$3,51 \times 10^{-4}$	2	q31.1
rs2302698	2,49	$3,51 \times 10^{-4}$	2	q31.1
rs10020695	2,49	$3,54 \times 10^{-4}$	4	q33
rs1784786	2,49	$3,55 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs10891288	2,49	$3,55 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs10891268	2,49	$3,57 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs7930326	2,49	$3,57 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs4936462	2,49	$3,57 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs949126	2,49	$3,57 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs255199	2,49	$3,58 \times 10^{-4}$	16	q21
rs7206660	2,49	$3,58 \times 10^{-4}$	16	q21
rs7186392	2,49	$3,58 \times 10^{-4}$	16	q21
rs1111413	2,49	$3,58 \times 10^{-4}$	16	q21
rs235094	2,49	$3,58 \times 10^{-4}$	16	q21
rs121891	2,49	$3,58 \times 10^{-4}$	16	q21
rs1152295	2,49	$3,58 \times 10^{-4}$	16	q21

continua...

Anexo D. Resultados obtidos com o método paramétrico LODLINK (SNPs com maior *LOD score* e menor p-valor) (continuação).

SNP	<i>LOD score</i>	p-valor	Cromossomo	Localização*
rs446170	2,49	$3,58 \times 10^{-4}$	16	q21
rs235127	2,49	$3,58 \times 10^{-4}$	16	q21
rs235128	2,49	$3,58 \times 10^{-4}$	16	q21
rs235136	2,49	$3,58 \times 10^{-4}$	16	q21
rs4686671	2,47	$3,74 \times 10^{-4}$	3	q29
rs9841295	2,47	$3,74 \times 10^{-4}$	3	q29
rs9852131	2,47	$3,74 \times 10^{-4}$	3	q29
rs11075614	2,46	$3,78 \times 10^{-4}$	16	q21
rs11075615	2,46	$3,78 \times 10^{-4}$	16	q21
rs11647790	2,46	$3,78 \times 10^{-4}$	16	q21
rs1862069	2,46	$3,85 \times 10^{-4}$	2	q31.1
rs2130724	2,46	$3,86 \times 10^{-4}$	3	q29
rs8058597	2,45	$3,90 \times 10^{-4}$	16	q22.1
rs9854429	2,43	$4,15 \times 10^{-4}$	3	q29
rs7205951	2,42	$4,23 \times 10^{-4}$	16	q21
rs500629	2,40	$4,45 \times 10^{-4}$	11	q23.2
rs11074618	2,39	$4,57 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs4479245	2,39	$4,57 \times 10^{-4}$	16	p11.2
rs2967289	2,39	$4,57 \times 10^{-4}$	16	q12.1
rs1184748	2,38	$4,64 \times 10^{-4}$	11	q23.2
rs6811381	2,38	$4,65 \times 10^{-4}$	4	q33
rs4232893	2,38	$4,66 \times 10^{-4}$	16	p11.2
rs7206828	2,36	$4,89 \times 10^{-4}$	16	p11.2
rs1104549	2,36	$4,89 \times 10^{-4}$	16	p11.2
rs1528317	2,36	$4,89 \times 10^{-4}$	16	p11.2
rs7197963	2,36	$4,89 \times 10^{-4}$	16	p11.2
rs7359491	2,36	$4,89 \times 10^{-4}$	16	p11.2
rs2214139	2,36	$4,89 \times 10^{-4}$	16	p11.2
rs12921028	2,36	$4,89 \times 10^{-4}$	16	p11.2
rs2359223	2,36	$4,89 \times 10^{-4}$	16	p11.2
rs6565284	2,36	$4,89 \times 10^{-4}$	16	p11.2
rs8050812	2,35	$4,98 \times 10^{-4}$	16	p11.2
rs11640392	2,34	$5,17 \times 10^{-4}$	16	q21
rs3943926	2,34	$5,17 \times 10^{-4}$	16	q21
rs4393359	2,33	$5,24 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs893174	2,33	$5,28 \times 10^{-4}$	16	q12.1
rs12933502	2,33	$5,28 \times 10^{-4}$	16	q12.1
rs2347642	2,33	$5,31 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs6497993	2,33	$5,31 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs7193248	2,33	$5,31 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs7193094	2,33	$5,31 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs2141479	2,31	$5,52 \times 10^{-4}$	4	q33
rs1420588	2,31	$5,53 \times 10^{-4}$	16	q12.1
rs8051634	2,31	$5,53 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs4787888	2,31	$5,56 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs4129952	2,31	$5,56 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs8044535	2,31	$5,57 \times 10^{-4}$	16	p11.2
rs1559308	2,30	$5,67 \times 10^{-4}$	16	q21
rs9924920	2,29	$5,81 \times 10^{-4}$	16	q21
rs736650	2,29	$5,82 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs10891291	2,29	$5,82 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs7192683	2,29	$5,83 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs7192193	2,29	$5,83 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs7199131	2,29	$5,83 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs1717072	2,29	$5,87 \times 10^{-4}$	4	q33

continua...

Anexo D. Resultados obtidos com o método paramétrico LODLINK (SNPs com maior *LOD score* e menor p-valor) (continuação).

SNP	<i>LOD score</i>	p-valor	Cromossomo	Localização*
rs11132841	2,29	$5,87 \times 10^{-4}$	4	q33
rs11643705	2,28	$5,93 \times 10^{-4}$	16	q21
rs11641070	2,28	$5,93 \times 10^{-4}$	16	q21
rs7189217	2,28	$5,93 \times 10^{-4}$	16	q21
rs12935628	2,28	$5,93 \times 10^{-4}$	16	q21
rs1592547	2,28	$5,99 \times 10^{-4}$	16	q12.1
rs400066	2,27	$6,06 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs375624	2,27	$6,06 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs416951	2,27	$6,06 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs430151	2,27	$6,06 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs8058855	2,27	$6,10 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs7111960	2,26	$6,27 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs10891214	2,26	$6,27 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs161137	2,26	$6,27 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs160826	2,26	$6,27 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs397539	2,26	$6,27 \times 10^{-4}$	11	q23.1
rs749767	2,26	$6,32 \times 10^{-4}$	16	p11.2
rs889548	2,26	$6,32 \times 10^{-4}$	16	p11.2
rs8061424	2,26	$6,35 \times 10^{-4}$	16	q21
rs6416719	2,25	$6,44 \times 10^{-4}$	16	q22.2
rs6499437	2,25	$6,44 \times 10^{-4}$	16	q22.2
rs6748047	2,25	$6,49 \times 10^{-4}$	2	q24.1
rs7569877	2,24	$6,64 \times 10^{-4}$	2	q24.3
rs198200	2,23	$6,78 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs198201	2,23	$6,78 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs198202	2,23	$6,78 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs381901	2,23	$6,78 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs834828	2,23	$6,80 \times 10^{-4}$	2	q24.1
rs11866053	2,21	$7,06 \times 10^{-4}$	16	q13
rs16958674	2,21	$7,06 \times 10^{-4}$	16	q13
rs4360943	2,21	$7,08 \times 10^{-4}$	16	p12.1
rs2356265	2,21	$7,08 \times 10^{-4}$	16	q12.1
rs4785289	2,21	$7,08 \times 10^{-4}$	16	q12.1
rs4785170	2,21	$7,08 \times 10^{-4}$	16	q12.1
rs16947433	2,21	$7,08 \times 10^{-4}$	16	q12.1
rs918702	2,21	$7,08 \times 10^{-4}$	16	q12.1
rs1850440	2,21	$7,18 \times 10^{-4}$	2	q24.3
rs406641	2,20	$7,35 \times 10^{-4}$	11	q23.3
rs10891914	2,20	$7,35 \times 10^{-4}$	11	q23.3
rs8054004	2,18	$7,68 \times 10^{-4}$	16	q12.1
rs1510986	2,18	$7,68 \times 10^{-4}$	16	q12.1
rs235138	2,18	$7,73 \times 10^{-4}$	16	q21
rs2408405	2,18	$7,76 \times 10^{-4}$	11	q22.2
rs2408406	2,18	$7,76 \times 10^{-4}$	11	q22.2
rs1940054	2,18	$7,76 \times 10^{-4}$	11	q22.2
rs6716515	2,17	$7,77 \times 10^{-4}$	2	q24.3
rs1424137	2,17	$7,77 \times 10^{-4}$	16	q22.2
rs2042423	2,17	$7,77 \times 10^{-4}$	16	q22.2
rs1424136	2,17	$7,77 \times 10^{-4}$	16	q22.2
rs9939836	2,17	$7,77 \times 10^{-4}$	16	q22.2
rs9939194	2,17	$7,77 \times 10^{-4}$	16	q22.3
rs1972586	2,16	$7,96 \times 10^{-4}$	16	q12.1
rs6714869	2,16	$7,99 \times 10^{-4}$	2	q24.1
rs408882	2,16	$8,01 \times 10^{-4}$	16	p12.1

continua...

Anexo D. Resultados obtidos com o método paramétrico LODLINK (SNPs com maior *LOD score* e menor p-valor) (conclusão).

SNP	<i>LOD score</i>	p-valor	Cromossomo	Localização*
rs377133	2,16	8,01 x 10 ⁻⁴	16	p12.1
rs10451084	2,16	8,01 x 10 ⁻⁴	16	p12.1
rs12692861	2,14	8,39 x 10 ⁻⁴	2	q24.3
rs6745253	2,14	8,39 x 10 ⁻⁴	2	q24.3
rs41188	2,14	8,40 x 10 ⁻⁴	16	q12.1
rs7201796	2,12	8,87 x 10 ⁻⁴	16	p11.2
rs1426389	2,12	8,92 x 10 ⁻⁴	11	q23.3
rs7933547	2,12	8,92 x 10 ⁻⁴	11	q23.3
rs4667556	2,12	9,00 x 10 ⁻⁴	2	q24.3
rs11642344	2,11	9,07 x 10 ⁻⁴	16	p12.1
rs1919502	2,11	9,13 x 10 ⁻⁴	4	q33
rs3924001	2,11	9,23 x 10 ⁻⁴	2	q24.3
rs11865731	2,10	9,30 x 10 ⁻⁴	16	p12.1
rs2239344	2,10	9,42 x 10 ⁻⁴	16	p12.1
rs6565245	2,10	9,43 x 10 ⁻⁴	16	p11.2
rs13333846	2,10	9,43 x 10 ⁻⁴	16	p11.2
rs10871456	2,10	9,43 x 10 ⁻⁴	16	p11.2
rs6497742	2,10	9,43 x 10 ⁻⁴	16	p12.1
rs2283548	2,09	9,48 x 10 ⁻⁴	16	p12.1
rs11692805	2,09	9,57 x 10 ⁻⁴	2	q24.3
rs11074815	2,09	9,58 x 10 ⁻⁴	16	p12.1
rs12597901	2,09	9,58 x 10 ⁻⁴	16	p12.1
rs12597906	2,09	9,58 x 10 ⁻⁴	16	p12.1
rs10167207	2,09	9,60 x 10 ⁻⁴	2	q24.1
rs4664229	2,09	9,60 x 10 ⁻⁴	2	q24.1
rs4664888	2,09	9,60 x 10 ⁻⁴	2	q24.1
rs17761044	2,09	9,67 x 10 ⁻⁴	16	p12.1
rs11899757	2,09	9,68 x 10 ⁻⁴	2	q24.3
rs10193179	2,08	9,75 x 10 ⁻⁴	2	q31.1
rs12447240	2,08	9,92 x 10 ⁻⁴	16	p11.1
rs11646005	2,08	9,92 x 10 ⁻⁴	16	p11.1
rs12933929	2,08	9,92 x 10 ⁻⁴	16	p11.1

Neste anexo (Anexo D) foram listados todos os SNPs com p-valor < 1 x 10⁻³, incluindo os 50 SNPs com menor p-valor. Em negrito estão destacadas as regiões genômicas consideradas suspeitas por mais de um método de bioinformática. *O genoma de referência para a delimitação da localização foi NCBI36/hg18.

8 Referências

1. Cushing H. The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism). *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1932;50:137-95.
2. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, Montori VM. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:1526-40.
3. Arnaldi G, Angeli A, Atkinson AB, Bertagna X, Cavagnini F, Chrousos GP, Fava GA, Findling JW, Gaillard RC, Grossman AB, Kola B, Lacroix A, Mancini T, Mantero F, Newell-Price J, Nieman LK, Sonino N, Vance ML, Giustina A, Boscaro M. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:5593-602.
4. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet.* 2006;367:1605-17.
5. Lacroix A, Bourdeau I. Bilateral adrenal Cushing's syndrome: macronodular adrenal hyperplasia and primary pigmented nodular adrenocortical disease. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2005;34:441-58.
6. Kirschner MA, Powell RD, Jr., Lipsett MB. Cushing's Syndrome: Nodular Cortical Hyperplasia of Adrenal Glands with Clinical and Pathological Features Suggesting Adrenocortical Tumor. *J Clin Endocrinol Metab.* 1964;24:947-55.
7. Lacroix A. ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23:245-59.
8. Findlay JC, Sheeler LR, Engeland WC, Aron DC. Familial adrenocorticotropin-independent Cushing's syndrome with bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;76:189-91.
9. Oheda T, Noguchi Y, Morio H, Terano T, Hirai A, Tamura T. Study on steroidogenic activity of ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia which occurred in brothers in a cancer family. *Folia Endocrinologica.* 1995;71:416-19.
10. Minami S, Sugihara H, Sato J, Tatsukuchi A, Sugisaki Y, Sasano H, Wakabayashi I. ACTH independent Cushing's syndrome occurring in siblings. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1996;44:483-8.
11. Someya T, Koyano H, Osawa Y. ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia (AIMAH) in two brothers and a sister. *Folia Endocrinologica.* 1996;72:762-66.
12. Imohl M, Koditz R, Stachon A, Muller KM, Nicolas V, Pfeilschifter J, Krieg M. [Catecholamine-dependent hereditary Cushing's syndrome - follow-up after unilateral adrenalectomy]. *Med Klin (Munich).* 2002;97:747-53.

13. Miyamura N, Taguchi T, Murata Y, Taketa K, Iwashita S, Matsumoto K, Nishikawa T, Toyonaga T, Sakakida M, Araki E. Inherited adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia with abnormal cortisol secretion by vasopressin and catecholamines: detection of the aberrant hormone receptors on adrenal gland. *Endocrine*. 2002;19:319-26.
14. Nies C, Bartsch DK, Ehlenz K, Wild A, Langer P, Fleischhacker S, Rothmund M. Familial ACTH-independent Cushing's syndrome with bilateral macronodular adrenal hyperplasia clinically affecting only female family members. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2002;110:277-83.
15. Lee S, Hwang R, Lee J, Rhee Y, Kim DJ, Chung UI, Lim SK. Ectopic expression of vasopressin V1b and V2 receptors in the adrenal glands of familial ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005;63:625-30.
16. Watson TD, Patel SJ, Nardi PM. Case 121: familial adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing syndrome. *Radiology*. 2007;244:923-6.
17. Vezzosi D, Cartier D, Regnier C, Otal P, Bennet A, Parmentier F, Plantavid M, Lacroix A, Lefebvre H, Caron P. Familial adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia with aberrant serotonin and vasopressin adrenal receptors. *Eur J Endocrinol*. 2007;156:21-31.
18. Gagliardi L, Hotu C, Casey G, Braund WJ, Ling KH, Dodd T, Manavis J, Devitt PG, Cutfield R, Rudzki Z, Scott HS, Torpy DJ. Familial vasopressin-sensitive ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia (VPs-AIMAH): clinical studies of three kindreds. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;70:883-91.
19. Bourdeau I, Boisselle A, Rioux D, Neculau M, Hamet P, A. L. Systematic clinical screening of members of a family with hereditary cortisol-secreting B-adrenergic responsive ACTH-Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia (AIMAH) reveals unsuspected subclinical Cushing's syndrome (CS) and aberrant B-adrenergic regulation of cortisol secretion. In: Program of the 89th Annual Meeting of the Endocrine Society. June 2-5, 2007. Toronto, Canada. Abstract OR54-2; 2007. p.148.
20. Antonini SR, Fragoso MC, Lacroix A. Hiperplasia adrenal macronodular independente de ACTH (AIMAH) - aspectos clínicos e moleculares. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004;48:620-36.
21. Christopoulos S, Bourdeau I, Lacroix A. Clinical and subclinical ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia and aberrant hormone receptors. *Horm Res*. 2005;64:119-31.

22. Costa MH, Lacroix A. Cushing's syndrome secondary to ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007;51:1226-37.
23. Bourdeau I, D'Amour P, Hamet P, Boutin JM, Lacroix A. Aberrant membrane hormone receptors in incidentally discovered bilateral macronodular adrenal hyperplasia with subclinical Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:5534-40.
24. Schteingart DE. The clinical spectrum of adrenocortical hyperplasia. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2012;19:176-82.
25. Ohashi A, Yamada Y, Sakaguchi K, Inoue T, Kubo M, Fushimi H. A natural history of adrenocorticotropin-independent bilateral adrenal macronodular hyperplasia (AIMAH) from preclinical to clinically overt Cushing's syndrome. *Endocr J.* 2001;48:677-83.
26. Swain JM, Grant CS, Schlinkert RT, Thompson GB, vanHeerden JA, Lloyd RV, Young WF. Corticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia: a clinicopathologic correlation. *Arch Surg.* 1998;133:541-5.
27. Yamada Y, Sakaguchi K, Inoue T, Kubo M, Fushimi H, Sekii K, Itatani H, Tsujimura T, Kameyama M. Preclinical Cushing's syndrome due to adrenocorticotropin-independent bilateral adrenocortical macronodular hyperplasia with concurrent excess of gluco- and mineralocorticoids. *Intern Med.* 1997;36:628-32.
28. Hayashi Y, Takeda Y, Kaneko K, Koyama H, Aiba M, Ikeda U, Shimada K. A case of Cushing's syndrome due to ACTH-independent bilateral macronodular hyperplasia associated with excessive secretion of mineralocorticoids. *Endocr J.* 1998;45:485-91.
29. Malchoff CD, Rosa J, DeBold CR, Kozol RA, Ramsby GR, Page DL, Malchoff DM, Orth DN. Adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia: an unusual cause of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989;68:855-60.
30. Goodarzi MO, Dawson DW, Li X, Lei Z, Shintaku P, Rao CV, Van Herle AJ. Virilization in bilateral macronodular adrenal hyperplasia controlled by luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:73-7.
31. Riemenschneider MJ, Perry A, Reifenberger G. Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *Lancet Neurol.* 2006;5:1045-54.
32. Wozniak K, Piaskowski S, Gresner SM, Golanska E, Bieniek E, Bigoszewska K, Sikorska B, Szybka M, Kulczycka-Wojdala D, Zakrzewska M, Zawlik I, Papierz W, Stawski R, Jaskolski DJ, Och W, Sieruta M, Liberski PP, Rieske P. BCR expression is decreased in meningiomas showing loss of

- heterozygosity of 22q within a new minimal deletion region. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;183:14-20.
33. Ragel BT, Jensen RL. Molecular genetics of meningiomas. *Neurosurg Focus*. 2005;19(5):E9.
  34. Pham MH, Zada G, Mosich GM, Chen TC, Giannotta SL, Wang K, Mack WJ. Molecular genetics of meningiomas: a systematic review of the current literature and potential basis for future treatment paradigms. *Neurosurg Focus*. 2011;30(5):E7.
  35. Pralong FP, Gomez F, Guillou L, Mosimann F, Franscella S, Gaillard RC. Food-dependent Cushing's syndrome: possible involvement of leptin in cortisol hypersecretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:3817-22.
  36. Rockall AG, Babar SA, Sohaib SA, Isidori AM, Diaz-Cano S, Monson JP, Grossman AB, Reznick RH. CT and MR imaging of the adrenal glands in ACTH-independent cushing syndrome. *Radiographics*. 2004;24:435-52.
  37. Verma A, Mohan S, Gupta A. ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia: imaging findings of a rare condition : A case report. *Abdom Imaging*. 2008;33:225-9.
  38. Doppman JL, Chrousos GP, Papanicolaou DA, Stratakis CA, Alexander HR, Nieman LK. Adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia: an uncommon cause of primary adrenal hypercortisolism. *Radiology*. 2000;216:797-802.
  39. Metser U, Miller E, Lerman H, Lievshitz G, Avital S, Even-Sapir E. 18F-FDG PET/CT in the evaluation of adrenal masses. *J Nucl Med*. 2006;47:32-7.
  40. Boland GW, Blake MA, Holalkere NS, Hahn PF. PET/CT for the characterization of adrenal masses in patients with cancer: qualitative versus quantitative accuracy in 150 consecutive patients. *AJR Am J Roentgenol*. 2009;192:956-62.
  41. Blake MA, Cronin CG, Boland GW. Adrenal imaging. *AJR Am J Roentgenol*. 2010;194:1450-60.
  42. Tessonnier L, Sebag F, Palazzo FF, Colavolpe C, De Micco C, Mancini J, Conte-Devolx B, Henry JF, Mundler O, Taieb D. Does 18F-FDG PET/CT add diagnostic accuracy in incidentally identified non-secreting adrenal tumours? *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008;35:2018-25.
  43. Bourdeau I, Stratakis CA. Cyclic AMP-dependent signaling aberrations in macronodular adrenal disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;968:240-55.
  44. Aiba M, Hirayama A, Iri H, Ito Y, Fujimoto Y, Mabuchi G, Murai M, Tazaki H, Maruyama H, Saruta T. Adrenocorticotrophic hormone-independent bilateral adrenocortical macronodular hyperplasia as a distinct subtype of

- Cushing's syndrome. Enzyme histochemical and ultrastructural study of four cases with a review of the literature. *Am J Clin Pathol*. 1991;96:334-40.
45. Sasano H, Suzuki T, Nagura H. ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia: immunohistochemical and in situ hybridization studies of steroidogenic enzymes. *Mod Pathol*. 1994;7:215-9.
  46. Morioka M, Ohashi Y, Watanabe H, Komatsu F, Jin TX, Suyama B, Tanaka H. ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia (AIMAH): report of two cases and the analysis of steroidogenic activity in adrenal nodules. *Endocr J*. 1997;44:65-72.
  47. Smals AG, Pieters GF, van Haelst UJ, Kloppenborg PW. Macronodular adrenocortical hyperplasia in long-standing Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984;58:25-31.
  48. Aron DC, Findling JW, Fitzgerald PA, Brooks RM, Fisher FE, Forsham PH, Tyrrell JB. Pituitary ACTH dependency of nodular adrenal hyperplasia in Cushing's syndrome. Report of two cases and review of the literature. *Am J Med*. 1981;71:302-6.
  49. Arlt W. Disorders of the adrenal cortex. In: Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J, editors. *Harrison's principles of internal medicine*. 18th ed. New York: McGraw-Hill; 2012. 2v. Chap.342, p. 2940-61.
  50. Hinkle PM, Sebag JA. Structure and function of the melanocortin2 receptor accessory protein (MRAP). *Mol Cell Endocrinol*. 2009;300:25-31.
  51. Webb TR, Clark AJ. Minireview: the melanocortin 2 receptor accessory proteins. *Mol Endocrinol*. 2010;24:475-84.
  52. Lacroix A, Bourdeau I, Lampron A, Mazzuco TL, Tremblay J, Hamet P. Aberrant G-protein coupled receptor expression in relation to adrenocortical overfunction. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;73:1-15.
  53. Lacroix A, Ndiaye N, Tremblay J, Hamet P. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocr Rev*. 2001;22:75-110.
  54. Lacroix A, Baldacchino V, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J. Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab*. 2004;15:375-82.
  55. Schorr I, Ney RL. Abnormal hormone responses of an adrenocortical cancer adenyl cyclase. *J Clin Invest*. 1971;50:1295-300.
  56. Hamet P, Larochelle P, Franks DJ, Cartier P, Bolte E. Cushing syndrome with food-dependent periodic hormonogenesis. *Clin Invest Med*. 1987;10:530-3.

57. Lacroix A, Bolte E, Tremblay J, Dupre J, Poitras P, Fournier H, Garon J, Garrel D, Bayard F, Taillefer R, et al. Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion--a new cause of Cushing's syndrome. *N Engl J Med*. 1992;327:974-80.
58. Reznik Y, Allali-Zerah V, Chayvialle JA, Leroyer R, Leymarie P, Travert G, Lebrethon MC, Budi I, Balliere AM, Mahoudeau J. Food-dependent Cushing's syndrome mediated by aberrant adrenal sensitivity to gastric inhibitory polypeptide. *N Engl J Med*. 1992;327:981-6.
59. Christopoulos S, Bourdeau I, Lacroix A. Aberrant expression of hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Pituitary*. 2004;7:225-35.
60. Preumont V, Mermejo LM, Damoiseaux P, Lacroix A, Maiter D. Transient efficacy of octreotide and pasireotide (SOM230) treatment in GIP-dependent Cushing's syndrome. *Horm Metab Res*. 2011;43:287-91.
61. N'Diaye N, Tremblay J, Hamet P, De Herder WW, Lacroix A. Adrenocortical overexpression of gastric inhibitory polypeptide receptor underlies food-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:2781-5.
62. Antonini SR, N'Diaye N, Baldacchino V, Hamet P, Tremblay J, Lacroix A. Analysis of the putative regulatory region of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene in food-dependent Cushing's syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;91:171-7.
63. Baldacchino V, Oble S, Decarie PO, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J, Lacroix A. The Sp transcription factors are involved in the cellular expression of the human glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor gene and overexpressed in adrenals of patients with Cushing's syndrome. *J Mol Endocrinol*. 2005;35:61-71.
64. de Groot JW, Links TP, Themmen AP, Looijenga LH, de Krijger RR, van Koetsveld PM, Hofland J, van den Berg G, Hofland LJ, Feelders RA. Aberrant expression of multiple hormone receptors in ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2010;163:293-9.
65. Libe R, Coste J, Guignat L, Tissier F, Lefebvre H, Barrande G, Ajzenberg C, Tauveron I, Clauser E, Dousset B, Bertagna X, Bertherat J, Groussin L. Aberrant cortisol regulations in bilateral macronodular adrenal hyperplasia: a frequent finding in a prospective study of 32 patients with overt or subclinical Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2010;163:129-38.
66. Mune T, Murase H, Yamakita N, Fukuda T, Murayama M, Miura A, Suwa T, Hanafusa J, Daido H, Morita H, Yasuda K. Eutopic overexpression of vasopressin v1a receptor in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:5706-13.

67. Lacroix A, Tremblay J, Rousseau G, Bouvier M, Hamet P. Propranolol therapy for ectopic beta-adrenergic receptors in adrenal Cushing's syndrome. *N Engl J Med*. 1997;337:1429-34.
68. Lacroix A, Hamet P, Boutin JM. Leuprolide acetate therapy in luteinizing hormone--dependent Cushing's syndrome. *N Engl J Med*. 1999;34:1577-81.
69. Cartier D, Lihrmann I, Parmentier F, Bastard C, Bertherat J, Caron P, Kuhn JM, Lacroix A, Tabarin A, Young J, Vaudry H, Lefebvre H. Overexpression of serotonin₄ receptors in cisapride-responsive adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:248-54.
70. Miguel V, Redal MA, Viale ML, Kahan M, Glerean M, Beskow A, Fainstein Day P. Aberrant expression of glucagon receptors in adrenal glands of a patient with Cushing's syndrome and ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. *Medicina (B Aires)*. 2010;70:254-6.
71. Mircescu H, Jilwan J, N'Diaye N, Bourdeau I, Tremblay J, Hamet P, Lacroix A. Are ectopic or abnormal membrane hormone receptors frequently present in adrenal Cushing's syndrome? *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:3531-6.
72. Bertherat J, Contesse V, Louiset E, Barrande G, Duparc C, Groussin L, Emy P, Bertagna X, Kuhn JM, Vaudry H, Lefebvre H. In vivo and in vitro screening for illegitimate receptors in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome: identification of two cases of gonadotropin/gastric inhibitory polypeptide-dependent hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:1302-10.
73. Mazzuco TL, Chabre O, Feige JJ, Thomas M. Aberrant expression of human luteinizing hormone receptor by adrenocortical cells is sufficient to provoke both hyperplasia and Cushing's syndrome features. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:196-203.
74. Mazzuco TL, Chabre O, Sturm N, Feige JJ, Thomas M. Ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene is a sufficient genetic event to induce benign adrenocortical tumor in a xenotransplantation model. *Endocrinology*. 2006;147:782-90.
75. Swords FM, Aylwin S, Perry L, Arola J, Grossman AB, Monson JP, Clark AJ. The aberrant expression of the gastric inhibitory polypeptide (GIP) receptor in adrenal hyperplasia: does chronic adrenocorticotropin exposure stimulate up-regulation of GIP receptors in Cushing's disease? *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:3009-16.
76. Antonini SR, Baldacchino V, Tremblay J, Hamet P, Lacroix A. Expression of ACTH receptor pathway genes in glucose-dependent insulintrophic peptide (GIP)-dependent Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;64:29-36.

77. Light K, Jenkins PJ, Weber A, Perrett C, Grossman A, Pistorello M, Asa SL, Clayton RN, Clark AJ. Are activating mutations of the adrenocorticotropin receptor involved in adrenal cortical neoplasia? *Life Sci.* 1995;56:1523-7.
78. Latronico AC, Reincke M, Mendonca BB, Arai K, Mora P, Allolio B, Wajchenberg BL, Chrousos GP, Tsigos C. No evidence for oncogenic mutations in the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:875-7.
79. Swords FM, Baig A, Malchoff DM, Malchoff CD, Thorner MO, King PJ, Hunyady L, Clark AJ. Impaired desensitization of a mutant adrenocorticotropin receptor associated with apparent constitutive activity. *Mol Endocrinol.* 2002;16:2746-53.
80. Hiroi N, Yakushiji F, Shimojo M, Watanabe S, Sugano S, Yamaguchi N, Miyachi Y. Human ACTH hypersensitivity syndrome associated with abnormalities of the ACTH receptor gene. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1998;48:129-34.
81. Swords FM, Noon LA, King PJ, Clark AJ. Constitutive activation of the human ACTH receptor resulting from a synergistic interaction between two naturally occurring missense mutations in the MC2R gene. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;213:149-54.
82. Weinstein LS, Liu J, Sakamoto A, Xie T, Chen M. Minireview: GNAS: normal and abnormal functions. *Endocrinology.* 2004;145:5459-64.
83. Brown RJ, Kelly MH, Collins MT. Cushing syndrome in the McCune-Albright syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:1508-15.
84. Fragoso MC, Domenice S, Latronico AC, Martin RM, Pereira MA, Zerbini MC, Lucon AM, Mendonca BB. Cushing's syndrome secondary to adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia due to activating mutations of GNAS1 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:2147-51.
85. Hsiao HP, Kirschner LS, Bourdeau I, Keil MF, Boikos SA, Verma S, Robinson-White AJ, Nesterova M, Lacroix A, Stratakis CA. Clinical and genetic heterogeneity, overlap with other tumor syndromes, and atypical glucocorticoid hormone secretion in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia compared with other adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:2930-7.
86. Balogh K, Racz K, Patocs A, Hunyady L. Menin and its interacting proteins: elucidation of menin function. *Trends Endocrinol Metab.* 2006;17:357-64.
87. Newey PJ, Thakker RV. Role of multiple endocrine neoplasia type 1 mutational analysis in clinical practice. *Endocr Pract.* 2011;17(Suppl 3):8-17.

88. Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010;24:355-70.
89. Skogseid B, Larsson C, Lindgren PG, Kvanta E, Rastad J, Theodorsson E, Wide L, Wilander E, Oberg K. Clinical and genetic features of adrenocortical lesions in multiple endocrine neoplasia type 1. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;75:76-81.
90. Costa MH, Domenice S, Toledo RA, Lourenco DM, Jr., Latronico AC, Pinto EM, Toledo SP, Mendonca BB, Fragoso MC. Glucose-dependent insulinotropic peptide receptor overexpression in adrenocortical hyperplasia in MEN1 syndrome without loss of heterozygosity at the 11q13 locus. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66:529-33.
91. Jang YH, Lim SB, Kim MJ, Chung HJ, Yoo HW, Byeon JS, Myung SJ, Lee W, Chun S, Min WK. Three novel mutations of the APC gene in Korean patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;200:34-9.
92. Aoki K, Taketo MM. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Sci.* 2007;120:3327-35.
93. Berthon A, Martinez A, Bertherat J, Val P. Wnt/beta-catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;351:87-95.
94. Hosogi H, Nagayama S, Kanamoto N, Yoshizawa A, Suzuki T, Nakao K, Sakai Y. Biallelic APC inactivation was responsible for functional adrenocortical adenoma in familial adenomatous polyposis with novel germline mutation of the APC gene: report of a case. *Jpn J Clin Oncol.* 2009;39:837-46.
95. Groen EJ, Roos A, Muntinghe FL, Enting RH, de Vries J, Kleibeuker JH, Witjes MJ, Links TP, van Beek AP. Extra-intestinal manifestations of familial adenomatous polyposis. *Ann Surg Oncol.* 2008;15:2439-50.
96. Gaujoux S, Pinson S, Gimenez-Roqueplo AP, Amar L, Ragazzon B, Launay P, Meatchi T, Libe R, Bertagna X, Audebourg A, Zucman-Rossi J, Tissier F, Bertherat J. Inactivation of the APC gene is constant in adrenocortical tumors from patients with familial adenomatous polyposis but not frequent in sporadic adrenocortical cancers. *Clin Cancer Res.* 2010;16:5133-41.
97. Blaker H, Sutter C, Kadmon M, Otto HF, Von Knebel-Doeberitz M, Gebert J, Helmke BM. Analysis of somatic APC mutations in rare extracolonic tumors of patients with familial adenomatous polyposis coli. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004;41:93-8.
98. Yamakita N, Murai T, Ito Y, Miura K, Ikeda T, Miyamoto K, Onami S, Yoshida T. Adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical

- hyperplasia associated with multiple colon adenomas/carcinomas which showed a point mutation in the APC gene. *Intern Med*. 1997;36:536-42.
99. Sudarshan S, Pinto PA, Neckers L, Linehan WM. Mechanisms of disease: hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer--a distinct form of hereditary kidney cancer. *Nat Clin Pract Urol*. 2007;4:104-10.
  100. King A, Selak MA, Gottlieb E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene*. 2006;25:4675-82.
  101. Badeloe S, Frank J. Clinical and molecular genetic aspects of hereditary multiple cutaneous leiomyomatosis. *Eur J Dermatol*. 2009;19:545-51.
  102. Matyakhina L, Freedman RJ, Bourdeau I, Wei MH, Stergiopoulos SG, Chidakel A, Walther M, Abu-Asab M, Tsokos M, Keil M, Toro J, Linehan WM, Stratakis CA. Hereditary leiomyomatosis associated with bilateral, massive, macronodular adrenocortical disease and atypical cushing syndrome: a clinical and molecular genetic investigation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:3773-9.
  103. Lehtonen HJ, Kiuru M, Ylisaukko-Oja SK, Salovaara R, Herva R, Koivisto PA, Vierimaa O, Aittomaki K, Pukkala E, Launonen V, Aaltonen LA. Increased risk of cancer in patients with fumarate hydratase germline mutation. *J Med Genet*. 2006;43:523-6.
  104. Bourdeau I, Antonini SR, Lacroix A, Kirschner LS, Matyakhina L, Lorang D, Libutti SK, Stratakis CA. Gene array analysis of macronodular adrenal hyperplasia confirms clinical heterogeneity and identifies several candidate genes as molecular mediators. *Oncogene*. 2004;23:1575-85.
  105. Bourdeau I, Lampron A, Costa MH, Tadjine M, Lacroix A. Adrenocorticotrophic hormone-independent Cushing's syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2007;14:219-25.
  106. Lampron A, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J, Lacroix A. Whole genome expression profiling of glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP)- and adrenocorticotropin-dependent adrenal hyperplasias reveals novel targets for the study of GIP-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:3611-8.
  107. Bourdeau I, Matyakhina L, Stergiopoulos SG, Sandrini F, Boikos S, Stratakis CA. 17q22-24 chromosomal losses and alterations of protein kinase a subunit expression and activity in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:3626-32.
  108. Stratakis CA, Boikos SA. Genetics of adrenal tumors associated with Cushing's syndrome: a new classification for bilateral adrenocortical hyperplasias. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007;3:748-57.

109. Assie G, Louiset E, Sturm N, Rene-Corail F, Groussin L, Bertherat J, Thomas M, Lefebvre H, Feige JJ, Clauser E, Chabre O, Cherradi N. Systematic analysis of G protein-coupled receptor gene expression in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia identifies novel targets for pharmacological control of adrenal Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:E253-62.
110. Ricarte Filho JC, Kimura ET. MicroRNAs: novel class of gene regulators involved in endocrine function and cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;50:1102-7.
111. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet*. 2012;13:358-69.
112. Bimpaki EI, Iliopoulos D, Moraitis A, Stratakis CA. MicroRNA signature in massive macronodular adrenocortical disease and implications for adrenocortical tumourigenesis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;72:744-51.
113. Almeida MQ, Harran M, Bimpaki EI, Hsiao HP, Horvath A, Cheadle C, Watkins T, Nesterova M, Stratakis CA. Integrated genomic analysis of nodular tissue in macronodular adrenocortical hyperplasia: progression of tumorigenesis in a disorder associated with multiple benign lesions. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:E728-38.
114. Almeida MQ, Azevedo MF, Xekouki P, Bimpaki EI, Horvath A, Collins MT, Karaviti LP, Jeha GS, Bhattacharyya N, Cheadle C, Watkins T, Bourdeau I, Nesterova M, Stratakis CA. Activation of cyclic AMP signaling leads to different pathway alterations in lesions of the adrenal cortex caused by germline PRKAR1A defects versus those due to somatic GNAS mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:E687-93.
115. Gagliardi L, Ling KH, Kok CH, Carolan J, Brautigan P, Kenyon R, D'Andrea RJ, Van der Hoek M, Hahn CN, Torpy DJ, Scott HS. Genome-wide gene expression profiling identifies overlap with malignant adrenocortical tumours and novel mechanisms of inefficient steroidogenesis in familial ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. *Endocr Relat Cancer*. 2012;19:L19-23.
116. Ogura M, Kusaka I, Nagasaka S, Yatagai T, Shinozaki S, Itabashi N, Nakamura T, Yokoyama M, Ishikawa SE, Ishibashi S. Unilateral adrenalectomy improves insulin resistance and diabetes mellitus in a patient with ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. *Endocr J*. 2003;50:715-21.
117. Iacobone M, Albiger N, Scaroni C, Mantero F, Fassina A, Viel G, Frego M, Favia G. The role of unilateral adrenalectomy in ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH). *World J Surg*. 2008;32:882-9.

118. Mazzuco TL, Chaffanjon P, Martinie M, Sturm N, Chabre O. Adrenal Cushing's syndrome due to bilateral macronodular adrenal hyperplasia: prediction of the efficacy of beta-blockade therapy and interest of unilateral adrenalectomy. *Endocr J*. 2009;56:867-77.
119. Lamas C, Alfaro JJ, Lucas T, Lecumberri B, Barcelo B, Estrada J. Is unilateral adrenalectomy an alternative treatment for ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia?: Long-term follow-up of four cases. *Eur J Endocrinol*. 2002;146:237-40.
120. Kobayashi T, Miwa T, Kan K, Takeda M, Sakai H, Kanazawa A, Tanaka A, Namiki K, Nagao T, Odawara M. Usefulness and limitations of unilateral adrenalectomy for ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia in a patient with poor glycemic control. *Intern Med*. 2012;51:1709-13.
121. Kageyama Y, Ishizaka K, Iwashina M, Sasano H, Kihara K. A case of ACTH-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia successfully treated by subtotal resection of the adrenal glands: four-year follow-up. *Endocr J*. 2002;49:227-9.
122. Oki K, Yamane K, Nakanishi S, Nakashima R, Jitsuiki K, Kohno N. Improvement of hypercortisolism by beta-blocker therapy in subclinical Cushing's syndrome associated with ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia. *Endocrine*. 2009;36:372-6.
123. Omori N, Nomura K, Omori K, Takano K, Obara T. Rational, effective metyrapone treatment of ACTH-independent bilateral macronodular adrenocortical hyperplasia (AIMAH). *Endocr J*. 2001;48:665-9.
124. Nagai M, Narita I, Omori K, Komura S, Arakawa M. Adrenocorticotrophic hormone-independent bilateral adrenocortical macronodular hyperplasia treated with mitotane. *Intern Med*. 1999;38:969-73.
125. Obata Y, Yamada Y, Baden MY, Hosokawa Y, Saisho K, Tamba S, Yamamoto K, Matsuzawa Y. Long-term efficacy of trilostane for Cushing's syndrome due to adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenocortical hyperplasia. *Intern Med*. 2011;50:2621-5.
126. Raff H, Raff JL, Findling JW. Late-night salivary cortisol as a screening test for Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:2681-6.
127. Nieman LK. Diagnostic tests for Cushing's syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;970:112-8.
128. Sohaib SA, Hanson JA, Newell-Price JD, Trainer PJ, Monson JP, Grossman AB, Besser GM, Reznick RH. CT appearance of the adrenal glands in adrenocorticotrophic hormone-dependent Cushing's syndrome. *AJR Am J Roentgenol*. 1999;172:997-1002.

129. Lingam RK, Sohaib SA, Vlahos I, Rockall AG, Isidori AM, Monson JP, Grossman A, Reznick RH. CT of primary hyperaldosteronism (Conn's syndrome): the value of measuring the adrenal gland. *AJR Am J Roentgenol*. 2003;181:843-9.
130. Vincent JM, Morrison ID, Armstrong P, Reznick RH. The size of normal adrenal glands on computed tomography. *Clin Radiol*. 1994;49:453-5.
131. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.
132. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet*. 2004;5:435-45.
133. Kim S, Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007;9:289-320.
134. Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol*. 2002;34:275-305.
135. Metherell LA, Chapple JP, Cooray S, David A, Becker C, Ruschendorf F, Naville D, Begeot M, Khoo B, Nurnberg P, Huebner A, Cheetham ME, Clark AJ. Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nat Genet*. 2005;37:166-70.
136. Affymetrix® Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty 6.0 User Guide. 4th ed. Santa Clara: Affymetrix Inc.; 2011.
137. Data Sheet Genome-Wide Human SNP Array 6.0. 2nd ed. Santa Clara: Affymetrix Inc.; 2009.
138. Affymetrix® GeneChip®Command Console® 3.0 User Manual. 5th ed. Santa Clara: Affymetrix, Inc.; 2009.
139. Cantor RM. Model-based linkage analysis of a binary trait. *Methods Mol Biol*. 2012;850:285-300.
140. Nowak DM, Pitarque JA, Molinari A, Bejjani BA, Gajecka M. Linkage analysis as an approach for disease-related loci identification. *Computational Methods in Science and Technology*. 2012;18(2):1-7.
141. Statistical Analysis for Genetic Epidemiology (S.A.G.E.) [computer program]. Version 6.1.0. Cleveland: Department of Epidemiology and Biostatistics, Case Western Reserve University; 2010.
142. Dawn Teare M, Barrett JH. Genetic linkage studies. *Lancet*. 2005;366:1036-44.

143. Rydzanicz M, Nath SK, Sun C, Podfigurna-Musiak M, Frajdenberg A, Mrugacz M, Winters D, Ratnamala U, Radhakrishna U, Bejjani BA, Gajicka M. Identification of novel suggestive loci for high-grade myopia in Polish families. *Mol Vis*. 2011;17:2028-39.
144. Diabetes Care. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. 2012;35 (Suppl 1):jan.
145. Jellinger PS, Smith DA, Mehta AE, Ganda O, Handelsman Y, Rodbard HW, Shepherd MD, Seibel JA. American Association of Clinical Endocrinologists' Guidelines for Management of Dyslipidemia and Prevention of Atherosclerosis. *Endocr Pract*. 2012;18(Suppl 1):1-78.
146. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., Roccella EJ. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*. 2003;42:1206-52.
147. Alencar GA, Fragoso MC, Yamaga LY, Lerario AM, Mendonca BB. (18)F-FDG-PET/CT imaging of ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia (AIMAH) demonstrating increased (18)F-FDG uptake. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:3300-1.
148. Li S, Jin Z, Koirala S, Bu L, Xu L, Hynes RO, Walsh CA, Corfas G, Piao X. GPR56 regulates pial basement membrane integrity and cortical lamination. *J Neurosci*. 2008;28:5817-26.
149. Vezzosi D, Libe R, Baudry C, Rizk-Rabin M, Horvath A, Levy I, Rene-Corail F, Ragazzon B, Stratakis CA, Vandecasteele G, Bertherat J. Phosphodiesterase 11A (PDE11A) gene defects in patients with acth-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH): functional variants may contribute to genetic susceptibility of bilateral adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:E2063-9.
150. Simon M, Bostrom JP, Hartmann C. Molecular genetics of meningiomas: from basic research to potential clinical applications. *Neurosurgery*. 2007;60:787-98.
151. Christiaans I, Kenter SB, Brink HC, van Os TA, Baas F, van den Munckhof P, Kidd AM, Hulsebos TJ. Germline SMARCB1 mutation and somatic NF2 mutations in familial multiple meningiomas. *J Med Genet*. 2011;48:93-7.
152. Smith MJ, O'Sullivan J, Bhaskar SS, Hadfield KD, Poke G, Caird J, Sharif S, Eccles D, Fitzpatrick D, Rawluk D, du Plessis D, Newman WG, Evans DG. Loss-of-function mutations in SMARCE1 cause an inherited disorder of multiple spinal meningiomas. *Nat Genet*. 2013;45:295-8.
153. Brastianos PK, Horowitz PM, Santagata S, Jones RT, McKenna A, Getz G, Ligon KL, Palescandolo E, Van Hummelen P, Ducar MD, Raza A,

- Sunkavalli A, Macconail LE, Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN, Hahn WC, Dunn IF, Beroukhir R. Genomic sequencing of meningiomas identifies oncogenic SMO and AKT1 mutations. *Nat Genet.* 2013;45:285-9.
154. Clark VE, Erson-Omay EZ, Serin A, Yin J, Cotney J, Ozduman K, Avsar T, Li J, Murray PB, Henegariu O, Yilmaz S, Gunel JM, Carrion-Grant G, Yilmaz B, Grady C, Tanrikulu B, Bakircioglu M, Kaymakcalan H, Caglayan AO, Sencar L, Ceyhun E, Atik AF, Bayri Y, Bai H, Kolb LE, Hebert RM, Omay SB, Mishra-Gorur K, Choi M, Overton JD, Holland EC, Mane S, State MW, Bilguvar K, Baehring JM, Gutin PH, Piepmeier JM, Vortmeyer A, Brennan CW, Pamir MN, Kilic T, Lifton RP, Noonan JP, Yasuno K, Gunel M. Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO. *Science.* 2013;339:1077-80.
155. Nieman LK. Approach to the patient with an adrenal incidentaloma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:4106-13.
156. Masserini B, Morelli V, Bergamaschi S, Ermetici F, Eller-Vainicher C, Barbieri AM, Maffini MA, Scillitani A, Ambrosi B, Beck-Peccoz P, Chiodini I. The limited role of midnight salivary cortisol levels in the diagnosis of subclinical hypercortisolism in patients with adrenal incidentaloma. *Eur J Endocrinol.* 2009;160:87-92.
157. Palmieri S, Morelli V, Polledri E, Fustinoni S, Mercadante R, Olgiati L, Eller Vainicher C, Cairoli E, Zhukouskaya VV, Beck-Peccoz P, Chiodini I. The role of salivary cortisol measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the diagnosis of subclinical hypercortisolism. *Eur J Endocrinol.* 2013;168:289-96.
158. Workman RJ, Vaughn WK, Stone WJ. Dexamethasone suppression testing in chronic renal failure: pharmacokinetics of dexamethasone and demonstration of a normal hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986;63:741-6.
159. McDermott S, O'Connor OJ, Cronin CG, Blake MA. Radiological evaluation of adrenal incidentalomas: current methods and future prospects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012;26:21-33.
160. Vernooij MW, Ikram MA, Tanghe HL, Vincent AJ, Hofman A, Krestin GP, Niessen WJ, Breteler MM, van der Lugt A. Incidental findings on brain MRI in the general population. *N Engl J Med.* 2007;357:1821-8.
161. Rao S, Rajkumar A, Kuruvilla S. Angiomatous meningioma: a diagnostic dilemma. *Indian J Pathol Microbiol.* 2008;51:53-5.
162. Ohba S, Yoshida K, Hirose Y, Ikeda E, Kawase T. Meningioma of the cerebellopontine angle in identical twins: a case report. *J Neurooncol.* 2010;98:411-5.

163. Kazumoto K, Uki J, Adachi J, Negishi T, Takeda F. Convexity angiomatous meningiomas in a mother and a daughter without evidence of neurofibromatosis. *No Shinkei Geka*. 1993;21:941-6.
164. Pendleton C, Olivi A, Brem H, Quinones-Hinojosa A. Harvey Cushing's Early Treatment of Meningiomas: The Untold Story. *World Neurosurg*. In press 2011.
165. Laws ER, Jr. Neurosurgery's man of the century: Harvey Cushing--the man and his legacy. *Neurosurgery*. 1999;45:977-82.
166. Ong LC, Jin Y, Song IC, Yu S, Zhang K, Chow PK. 2-[18F]-2-deoxy-D-glucose (FDG) uptake in human tumor cells is related to the expression of GLUT-1 and hexokinase II. *Acta Radiol*. 2008;49:1145-53.
167. Deandreis D, Leboulleux S, Caramella C, Schlumberger M, Baudin E. FDG PET in the management of patients with adrenal masses and adrenocortical carcinoma. *Horm Cancer*. 2011;2:354-62.
168. Jeong SJ, Li S, Luo R, Strokes N, Piao X. Loss of Col3a1, the gene for Ehlers-Danlos syndrome type IV, results in neocortical dyslamination. *PLoS One*. 2012;7:e29767.
169. Kim JE, Han JM, Park CR, Shin KJ, Ahn C, Seong JY, Hwang JI. Splicing variants of the orphan G-protein-coupled receptor GPR56 regulate the activity of transcription factors associated with tumorigenesis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136:47-53.
170. Paavola KJ, Stephenson JR, Ritter SL, Alter SP, Hall RA. The N terminus of the adhesion G protein-coupled receptor GPR56 controls receptor signaling activity. *J Biol Chem*. 2011;286:28914-21.

Apêndice

JCEM

THE JOURNAL
OF CLINICAL
ENDOCRINOLOGY
& METABOLISM

NOVEMBER 2011 • VOLUME 96 • NUMBER 11

¹⁸F-FDG-PET/CT Imaging of ACTH-Independent Macronodular Adrenocortical Hyperplasia (AIMAH) Demonstrating Increased ¹⁸F-FDG Uptake

Guilherme Asmar Alencar, Maria Candida Barisson Villares Fragoso, Lilian Yuri Itaya Yamaga, Antonio Marcondes Lerario, and Berenice Bilharinho Mendonça

Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM-42 (G.A.A., M.C.B.V.F., A.M.L., B.B.M.), Unidade de Suprarrenal, Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 05403-900 São Paulo, Brazil; and Setor de Medicina Nuclear (L.Y.I.Y.), Departamento de Imagem, Hospital Israelita Albert Einstein, 05652-900 São Paulo, Brazil

Three nonrelated women (ages, 49, 51, and 60 yr) exhibiting clinical features of hypercortisolism were diagnosed with ACTH-independent Cushing's syndrome. Endocrine evaluations revealed an abnormal overnight 1-mg dexamethasone suppression test (plasma cortisol, 21.8, 19.7, and 12.2 μ g/dl, respectively; normal, <1.8 μ g/dl), elevated 24-h urinary total cortisol (364, 811, and 410 μ g/24 h, respectively; normal, 30–300 μ g/24 h), and undetectable plasma ACTH. Unenhanced computed tomography revealed bilateral macronodular adrenal masses, with attenuation values up to 10, 25, and 23 Hounsfield units, respectively. Integrated 2-[fluorine 18] fluoro-2-deoxy-D glucose (¹⁸F-FDG) positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) revealed that ¹⁸F-FDG uptake in these bilateral adrenal masses was visibly higher than that in the liver (Fig. 1). The maximum standardized uptake value (SUVmax), which is an index used to assess disease activity in FDG-PET imaging, was unexpectedly increased in these adrenal masses, reaching levels usually seen in malignant tumors and metastases (SUVmax >3.1) (1–4). The patients underwent bilateral adrenalectomy, and pathological findings confirmed the clinical hypothesis of ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia (AIMAH).

¹⁸F-FDG-PET/CT is suggested to be valuable in discriminating benign from malignant adrenal masses (3, 4). It has been recognized, however, that at least 5% of adrenal abnormalities interpreted as positive by FDG-PET are false-positives for malignancy (1, 5). As far as we know, this is the first report demonstrating that AIMAH, a benign adrenal disease, may exhibit an intense ¹⁸F-FDG

uptake on a PET/CT and should therefore be considered in the differential diagnosis of adrenal lesions with increased ¹⁸F-FDG activity, such as carcinomas and metastases.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Guilherme Asmar Alencar, M.D., Avenue Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 155 - 2º andar, Bloco 6, 05403-900 São Paulo, Brazil. E-mail: guigalencar@yahoo.com.br.

Disclosure Summary: G.A.A. has received grant support from the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES). M.C.B.V.F. has received grant support from the São Paulo Research Foundation (FAPESP 2010/12702-1). L.Y.I.Y., A.M.L., and B.B.M. have nothing to declare.

References

1. Blake MA, Cronin CG, Boland GW 2010 Adrenal Imaging. *AJR Am J Roentgenol* 194:1450–1460
2. Dudeczak R, Traub-Weidinger T 2010 PET and PET/CT in endocrine tumours. *Eur J Radiol* 73:481–493
3. Boland GW, Blake MA, Holalkere NS, Hahn PF 2009 PET/CT for the characterization of adrenal masses in patients with cancer: qualitative versus quantitative accuracy in 150 consecutive patients. *AJR Am J Roentgenol* 192:956–962
4. Metser U, Miller E, Lerman H, Lievshitz G, Avital S, Even-Sapir E 2006 ¹⁸F-FDG PET/CT in the evaluation of adrenal masses. *J Nucl Med* 47:32–37
5. Chong S, Lee KS, Kim HY, Kim YK, Kim BT, Chung MJ, Yi CA, Kwon GY 2006 Integrated PET-CT for the characterization of adrenal gland lesions in cancer patients: diagnostic efficacy and interpretation pitfalls. *Radiographics* 26:1811–1826

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2011 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2011-1397 Received May 2, 2011. Accepted July 27, 2011.

Abbreviations: AIMAH, ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia; ¹⁸F-FDG, 2-[fluorine 18] fluoro-2-deoxy-D glucose; PET/CT, positron emission tomography/computed tomography; SUVmax, maximum standardized uptake value.

FIG. 1. Transaxial images of ^{18}F -FDG-PET/CT in three patients with AIMAH, demonstrating bilateral adrenal masses with increased ^{18}F -FDG uptake in comparison to liver. SUVmax was elevated in these adrenal masses, reaching levels (arrows) usually seen in malignant tumors and metastases (SUVmax >3.1).

Download PowerPoint figures from
The Endocrine Society journals for teaching purposes!
www.endo-society.org

Endocrine Press

Diagnostic Dilemmas

IMAGES IN ENDOCRINOLOGY

Leonard Wartofsky, MD
Editor

SECOND EDITION

Editor

Leonard Wartofsky, MD

DIAGNOSTIC DILEMMAS: IMAGES IN ENDOCRINOLOGY, 2ND EDITION

Director, Books Development: Maxine Aldred

Group Managing Editor & Associate Director: Scott C. Herman

Product/Production Manager: Cynthia T. Richardson

Marketing Manager, Publications: Leticia Barnes-Long

Peer Review Specialist: Rebecca Kelly

The statements and opinions expressed in this publication are those of the individual authors and do not necessarily reflect the views of The Endocrine Society. The Endocrine Society is not responsible or liable in any way for the currency of the information, for any errors, omissions or inaccuracies, or for any consequences arising therefrom. With respect to any drugs mentioned, the reader is advised to refer to the appropriate medical literature and the product information currently provided by the manufacturer to verify appropriate dosage, method and duration of administration, and other relevant information. In all instances, it is the responsibility of the treating physician or other health care professional, relying on independent experience and expertise, as well as knowledge of the patient, to determine the best treatment for the patient.

Copyright © September 2013 by The Endocrine Society, 8401 Connecticut Avenue, Suite 900, Chevy Chase, MD 20815. All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, posted on the Internet, or transmitted in any form, by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without written permission of the publisher.

Requests for permission for reproduction should be directed to The Endocrine Society Publications Department: <http://www.endo-society.org/journals/rights.cfm>, or send an email to permissions@endo-society.org. For more information or to purchase copies, please contact Society Services by telephone at 888-363-6762 or 301-941-0210 or email at societyservices@endo-society.org, or visit the online store: www.endo-society.org/store.

ISBN: 978-1-936704-15-6

Library of Congress Control Number: 2013937219

Contributors

Ejigayehu G. Abate, MD

Guilherme Asmar Alencar, MD

Takao Ando, MD, PhD

D. Arpaia, MD

Otarod Bahrani, MD

Nicolaas A. Bakker, MD, PhD

C. Bellevicine, MD

John Stuart Bevan, MD, FRCP

B. Biondi, MD

Frederic Castinetti, MD, PhD

William H. Chong, MD

Michael T. Collins, MD

Luiz C. Conti-Freitas, MD

S. Corbetta, MD, PhD

Salvatore Maria Corsello, MD

G. H. Daniels, MD

Robin P.F. Dullaart, MD, PhD

Alexander T. Faje, MD

Marco Faustini-Fustini, MD

Marcello Filopanti, MD, PhD

Maria Candida Barisson Villares
Fragoso, MD, PhD

R. Gaz, MD

Andor W.J.M. Glaudemans,
MD, PhD

Alyse Goldberg, MD

Patrícia M. Gomes, MD

Honglin Hu, MD, PhD

Toshiro Iizuka, MD

S. Ippolito, MD

Yasumasa Iwasaki, MD, PhD

Atsushi Kawakami, MD, PhD

Philip M. Kluin, MD, PhD

Pratima Kumar, MD, FACE

Jorge D. Machicado, MD

Léa M. Z. Maciel, MD

Patrícia K. R. Magalhães, MD

Elena Malchiodi, MD

Nicola Martinelli, MD, PhD

Susan Christina McGeoch, BSc
(Med Sci), MD, MRCP

Francisco V. Mello Filho, MD

Kan Nakamura, MD, PhD

Marcel Nijland, MD

Mitsuru Nishiyama, MD, PhD

Mariko Ogata, MD

Oliviero Olivieri, MD

Philip R. Orlander, MD

Rosa Maria Paragliola, MD

E. Passeri, MD

Robert Pichler, MD, PhD

Armin Rashidi, MD

D.S. Ross, MD

Marek Ruchala, MD, PhD

P.M. Sadow, MD

Maria Segni, MD

Edson G. Soares, MD

Anna Spada, MD, PhD

N. Stathatos, MD

Ewelina Szczepanek-Parulska,
MD, PhD

David Taieb, MD, PhD

Akira Takeshita, MD, PhD

Kai-Jen Tien, MD

Nicholas A. Tritos, MD, DSc

G. Troncone, MD

Toshiro Usa, MD, PhD

J. Marc C. Van Dijk, MD, PhD

Stan Van Uum, MD, PhD

J.P.H. van Wijk, MD, PhD

Fritz-Line Vélayoudom-Céphise,
MD, PhD

Xiaoqing Xi, MD

Shozo Yamada, MD, PhD

Nai-Cheng Yeh, MD

P.M.J. Zelissen, MD, PhD

Matteo Zoli, MD

20 A 49-year-old Woman Presenting with Bilateral Adrenal Masses

Guilherme Asmar Alencar, MD, and Maria Candida Barisson Villares Fragoso, MD, PhD

A 49-year-old woman exhibiting clinical features of hypercortisolism (supraclavicular fat pads, buffalo hump, truncal obesity, easy bruising and proximal muscle weakness) was diagnosed with adrenocorticotropin (ACTH)-independent Cushing's syndrome. Hormonal evaluations revealed an abnormal overnight 1-mg dexamethasone suppression test (plasma cortisol: 32 µg/dL; normal: <1.8 µg/dL), elevated 24-hour urinary total cortisol (364 µg/24 h; normal: 30 to 300 µg/24 h), elevated midnight salivary cortisol (0.42 µg/dL; normal: ≤0.13 µg/dL), suppressed dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) (<80 ng/mL; normal: 189 to 2050 ng/mL) and undetectable plasma ACTH (<5.0 pg/mL; normal: 10 to 46 pg/mL). Unenhanced abdominal computed tomography (CT) revealed bilateral adrenal masses, with attenuation values up to 10 Hounsfield units (HU) (Figure 20-1).

The baseline endocrine evaluation was followed by an *in vivo* protocol to investigate the presence of aberrant hormone receptors in the adrenal glands (1, 2). An abnormal cortisol response (57% increase in plasma cortisol levels) was observed after provocative testing with terlipressin (0.5 mg IV), indicating vasopressin receptors aberrantly coupled to steroidogenesis in the adrenal cortex. Integrated 2-[fluorine-18] fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography/computed tomography (¹⁸F-FDG-PET/CT) revealed that ¹⁸F-FDG uptake in the bilateral adrenal masses was visibly higher than that in the liver (Figure 20-2). The maximum standardized uptake value (SUVmax), which is an index used to assess metabolic disease activity in FDG-PET imaging, was increased in the adrenal masses, reaching levels usually seen in malignant tumors and metastases (SUVmax: > 3.1) (3, 4).

FIG. 20-1. Unenhanced CT in axial view (A) and contrast-enhanced CT in coronal view (B) showing bilateral adrenal masses (arrows).

FIG. 20-2. Transaxial images of ^{18}F -FDG-PET/CT showing bilateral adrenal masses with increased ^{18}F -FDG uptake in comparison to liver. Maximum standardized uptake value (SUVmax) was elevated in these adrenal masses (arrows).

1. BASED ON THESE FINDINGS, THE MOST LIKELY DIAGNOSIS IS:

- Bilateral adrenal adenoma
- Bilateral adrenal carcinoma
- Adrenal metastasis
- ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia
- Primary pigmented nodular adrenocortical disease

2. THE TREATMENT USUALLY RECOMMENDED FOR THIS CONDITION IS:

- Bilateral total adrenalectomy
- Unilateral adrenalectomy
- Medical treatment with adrenal enzyme inhibitors
- Specific pharmacological therapy with antagonists of aberrant hormone receptors
- None of the above

Bilateral total adrenalectomy is the standard treatment for this condition. However, in an attempt to control hypercortisolism and avoid lifelong glucocorticoid replacement therapy, the patient was submitted for a laparoscopic total right adrenalectomy and a subtotal left adrenalectomy (with approximately 2/3 of the left gland left intact). The extent of the surgical resection was guided by ^{18}F -FDG-PET/CT imaging with the

objective of primarily removing areas with higher ^{18}F -FDG uptake (Figure 20-3).

FIG. 20-3. Macroscopic view (**A**) of resected right adrenal gland (*long arrow*) and nodule resected from left adrenal gland (*short arrow*). 50 g of adrenal tissue was excised during surgery and several yellowish nodules of different sizes were seen on surface of right adrenal gland. Histological view (**B**) of resected adrenal tissue showing presence of large cortical cells with clear cytoplasm (lipid-rich), forming string-like structures and small cells with compact cytoplasm (lipid-poor), forming island-like structures. Hematoxylin and eosin staining.

3. THE MACROSCOPIC AND HISTOLOGICAL FINDINGS WERE TYPICAL OF THE FOLLOWING:

- a. Adrenal adenoma
- b. Adrenal carcinoma
- c. Adrenal metastasis
- d. ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia
- e. Primary pigmented nodular adrenocortical disease

Diagnosis

ACTH-Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia.

Discussion

Endogenous Cushing's syndrome (CS) is caused by primary adrenal over-secretion of cortisol in approximately 15 to 20% of cases (5). Bilateral lesions are involved in 10 to 15% of adrenal CS and include ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH), primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) and, rarely, bilateral adenoma or carcinoma (5).

AIMAH is an infrequent cause of CS first described by Kirschner *et al.* in 1964 (6). Most cases of this disease become clinically manifest during the fifth and sixth decades of life, which is a later age of onset in comparison to other causes of CS. The equal gender distribution in AIMAH also contrasts with the female predominance in most causes of endogenous CS (7). Subclinical CS seems to be the most frequent presentation of AIMAH and, in some patients, adrenal lesions are found incidentally during the radiological investigation of another disease (8).

The diagnosis of AIMAH is suggested by imaging studies (CT scan or magnetic resonance imaging) in patients with the biochemical demonstration of ACTH-

independent CS. On the CT scan, numerous nodules of soft tissue density measuring up to 5 cm in diameter usually distort both adrenal glands. The adrenals sometimes seem to be diffusely enlarged without macroscopic nodules (8). In PPNAD, the adrenal glands are usually less enlarged; cross-sectional imaging frequently reveals normal to slightly hyperplastic adrenals and the nodules do not generally exceed 5 mm (9). It has recently been recognized that AIMAH, a benign adrenal disease, may exhibit intense ^{18}F -FDG uptake on a PET/CT scan and should therefore be considered in the differential diagnosis of malignant adrenal lesions with increased ^{18}F -FDG activity, such as carcinoma and metastasis (10).

Although AIMAH is a clinical entity known for nearly 50 years, the pathophysiology of this disease has not been fully clarified. There is evidence that steroidogenesis in AIMAH is regulated by hormones other than ACTH as a result of the aberrant expression of their respective receptors in adrenocortical tissue (1). In vivo investigative protocols have been developed to screen patients with AIMAH for aberrant receptors (1, 2). However, it is not totally clear whether aberrant hormone receptors are a primary phenomenon responsible for the pathogenesis of AIMAH or an epiphenomenon resulting from cell proliferation and dedifferentiation, although there is evidence in favor of the former hypothesis (8).

Surgical treatment is recommended for the majority of patients with AIMAH and CS, but it is questionable whether bilateral adrenalectomy should always be performed (11). In the patient described herein, the extent of surgical resection was guided by ^{18}F -FDG-PET/CT imaging and areas with higher ^{18}F -FDG uptake were targeted with the aim of controlling hypercortisolism and avoiding lifelong glucocorticoid replacement therapy. Longer follow up

of the patient is needed to clarify whether this surgical strategy is worthwhile.

Subsequent Follow-up on the Patient

Two years after surgery, the patient still requires low doses of glucocorticoid replacement therapy. Throughout follow-up, blood pressure control improved, body weight returned to normal (18.9 kg/m²) and the clinical features of hypercortisolism gradually disappeared. The most recent laboratory evaluation revealed unsuppressed plasma ACTH levels (19 pg/mL; normal: 10 to 46 pg/mL) and a basal cortisol of 5.7 µg/dL (normal: 8 to 25 µg/dL). Based on these results, the patient is expected to stop the glucocorticoid replacement regimen soon.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Berenice Bilharinho de Mendonça, Dr. Lilian Yuri Itaya Yamaga, Dr. Gilberto Carlos Gomes, Dr. Manoel de Souza Rocha, Dr. Sheila Aparecida Coelho Siqueira and Dr. Antônio Marcondes Lerário for their suggestions and technical support.

References

1. Lacroix A, Ndiaye N, Tremblay J, Hamet P 2001 Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocr Rev* 22:75-110
2. Bertherat J, Contesse V, Louiset E, Barrande G, Duparc C, Groussin L, Emy P, Bertagna X, Kuhn JM, Vaudry H, Lefebvre H 2005 In vivo and in vitro screening for illegitimate receptors in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome: identification of two cases of gonadotropin/gastric inhibitory polypeptide-dependent hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1302-1310
3. Metser U, Miller E, Lerman H, Lievshitz G, Avital S, Even-Sapir E 2006 18F-FDG PET/CT in the evaluation of adrenal masses. *J Nucl Med* 47:32-37
4. Boland GW, Blake MA, Holalkere NS, Hahn PF 2009 PET/CT for the characterization of adrenal masses in patients with cancer: qualitative versus quantitative accuracy in 150 consecutive patients. *AJR Am J Roentgenol* 192:956-962.
5. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK 2006 Cushing's syndrome. *Lancet* 367:1605-1617
6. Kirschner MA, Powell RD, Jr., Lipsett MB 1964 Cushing's Syndrome: Nodular Cortical Hyperplasia of Adrenal Glands with Clinical and Pathological Features Suggesting Adrenocortical Tumor. *J Clin Endocrinol Metab* 24:947-955
7. Costa MH, Lacroix A 2007 Cushing's syndrome secondary to ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 51:1226-1237
8. Lacroix A 2009 ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23:245-259
9. Rockall AG, Babar SA, Sohaib SA, Isidori AM, Diaz-Cano S, Monson JP, Grossman AB, Reznek RH 2004 CT and MR imaging of the adrenal glands in ACTH-independent cushing syndrome. *Radiographics* 24:435-452
10. Alencar GA, Fragoso MC, Yamaga LY, Lerario AM, Mendonca BB 2011 (18)F-FDG-PET/CT imaging of ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia (AIMAH) demonstrating increased (18)F-FDG uptake. *J Clin Endocrinol Metab* 96:3300-3301
11. Lacroix A, Bourdeau I 2005 Bilateral adrenal Cushing's syndrome: macronodular adrenal hyperplasia and primary pigmented nodular adrenocortical disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 34:441-458

Alencar GA, Fragoso MCBV, Yamaga LYI, Lerario AM, Mendonca BB 2011 ¹⁸F-FDG-PET/CT Imaging of ACTH-Independent Macronodular Adrenocortical Hyperplasia (AIMAH) Demonstrating Increased ¹⁸F-FDG Uptake. *J Clin Endocrinol Metab* 96: 3300-3301

Answers

Question 1. d

Question 2. a

Question 3. d