MARCELA RASSI DA CRUZ

**Investigação genética por sequenciamento paralelo em
larga escala do hiperaldosteronismo primário causado
por hiperplasia adrenal cortical unilateral ou bilateral**

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

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Madson Queiroz de Almeida

(Versão corrigida. Resolução CoPGr nº 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo
2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rassi-Cruz, Marcela

Investigação genética por sequenciamento paralelo
em larga escala do hiperaldosteronismo primário
causado por hiperplasia adrenal cortical unilateral
ou bilateral / Marcela Rassi-Cruz. -- São Paulo,
2020.

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

Programa de Endocrinologia.

Orientador: Madson Queiroz de Almeida.

Descritores: 1.Hiperaldosteronismo 2.Hipertensão
3.Hiperplasia adrenal 4.Genética 5.Fosfodiesterases
6.Canais iônicos

USP/FM/DBD-158/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

Aos meus pais, Sérgio (in memoriam) e Cristiane, por todo amor e apoio; e por serem minha maior referência e exemplos de responsabilidade, dedicação e trabalho.

A minha irmã e melhor amiga, Carolina, por estar sempre ao meu lado, me ajudando e apoiando em tudo.

Ao meu bem, Luiz Eduardo, por me apoiar e compartilhar esta grande conquista comigo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela possibilidade de trilhar este caminho e alcançar esta vitória.

Ao meu orientador Prof. Dr. Madson Queiroz de Almeida, por toda ajuda e parceria nesta caminhada. Exemplo e inspiração de profissional e pesquisador, sempre disponível e disposto a me ajudar com o que fosse preciso. Sua orientação, conhecimento e expertise tornaram possível a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Cândida Barisson Villares Fragoso, pelo exemplo de altruísmo e assistência humanizada aos pacientes.

Às Profas. Dras. Berenice Bilharinho de Mendonça e Ana Claudia Latrônico, pelo incentivo à realização deste projeto e pelo exemplo de ser humano, profissional e pesquisadora que são para mim.

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

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

Ao Dr. Antônio Lerário, pelas contribuições nas análises de bioinformática.

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

A todas as funcionárias do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42, em especial à Mirian, Mariana, Mônica, Luciana, Andresa, Nilda (*in memoriam*), Rosangele, Cidinha, Fran e Cristina, pela ajuda e contribuições constantes.

À querida amiga Letícia Vilela, pelos ensinamentos de bancada transmitidos, por toda paciência e ajuda na realização deste trabalho.

Às amigas e também companheiras de pós-graduação Amanda Meneses, Lia Lousada e Thais Castanheira, que desde a residência dividem comigo as dificuldades e alegrias desta caminhada. Obrigada pelo companheirismo, carinho e amizade.

Às amigadas feitas durante os anos de convivência na Unidade de Suprarrenal: Vânia Balderrama, Janaina Petenuci, Helaine Charchar e Tatiana Goldbaum, obrigada pela companhia sempre agradável, por toda ajuda e por tornarem essa caminhada mais proveitosa.

A todos os colegas do LIM42 e da pós-graduação pelas trocas de conhecimento e experiências nestes anos. Em especial ao Augusto Garcia e Anna Flávia Benedetti pela ajuda na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Constantine Stratakis e toda equipe do seu laboratório no NIH, em especial Fabio Faucz, Andrea Gutierrez, Edra London e Lucy Sierra, pela recepção, convivência sempre agradável e por todos os conhecimentos transmitidos. Obrigada por tornarem possível a realização de parte dos estudos funcionais deste trabalho.

À Soninha, Zé Maria e Guga, que me receberam de braços abertos e com muito carinho. Nunca me esquecerei da assistência ofertada durante o período que morei nos Estados Unidos com vocês. Agradeço em especial ao Prof. Dr. e amigo Simão Lottenberg por ter me apresentado à essa família sensacional.

Aos membros participantes da minha banca de qualificação, Profa. Dra. Maria Cândida Barisson Villares Fragoso, Profa. Dra. Tânia Aparecida Sartori Sanchez Bachega e Profa. Dra. Ana Amelia Fialho de Oliveira Hoff, pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aprimoramento desta tese.

À minha mãe, Cristiane, pelo amor incondicional e pelo exemplo e inspiração de ser humano que é para mim.

Ao meu pai, Sérgio (*in memoriam*), que tristemente partiu ao longo desta jornada, por seu amor, integridade e caráter que são espelho e inspiração para mim.

À minha irmã, Carolina, pelo amor, apoio e torcida em cada vitória alcançada.

À minha avó, Najla, pelo amor dedicado a mim e pelo incentivo e torcida durante toda esta caminhada.

Ao meu avô, Said (*in memoriam*), pelo amor e exemplo de médico que sempre foi para mim.

À toda minha família, tios, tias, primas e primos que tanto torcem pelo meu sucesso.

Ao meu amor, Luiz Eduardo, por todo apoio e por tornar esta caminhada mais leve e feliz.

Aos meus amigos, pelo apoio, incentivo e compreensão do tempo de convívio muitas vezes reduzido para a realização deste projeto.

Aos pacientes e seus familiares, por aceitarem participar e contribuir com este projeto.

Agradecimentos Especiais

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Auxílio Pesquisa: 2015/17049-8; 2017/13394-8; 2018/23470-6) e ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Auxílio Pesquisa: 403256/2016-0), que aprovaram e financiaram a execução deste projeto, pela confiança que dedica aos pesquisadores e à pesquisa científica.

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de quadros

Lista de gráficos

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Hiperaldosteronismo Primário (HP).....	2
1.2	Aspectos Genéticos do HP	8
1.2.1	Hiperaldosteronismo familiar.....	10
1.2.2	Aldosteronomas	14
1.2.3	Hiperplasia adrenal cortical unilateral e bilateral	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivos Específicos	19
3	MÉTODOS.....	20
3.1	Considerações Éticas	21
3.2	Avaliações Hormonais e Estudos Moleculares	21
3.3	Casuística Para os Estudos Moleculares.....	21
3.4	Estudos Moleculares.....	25
3.4.1	Extração de ácido ribonucleico (RNA).....	25
3.4.2	Sequenciamento Automático pelo método de Sanger	26
3.4.3	Sequenciamento paralelo em larga escala.....	28
3.4.4	Análise de bioinformática	30
3.4.5	Seleção das variantes de interesse.....	35
3.5	Imunohistoquímica	37
3.6	Estudos Funcionais	39
3.6.1	Avaliação da atividade da proteína quinase A (PKA) em tecido adrenal congelado	39
3.6.2	Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real.....	40
3.6.3	Avaliação funcional das variantes em genes da família das fosfodiesterases	41
3.6.3.1	Mutagênese	41
3.6.3.2	Cultura celular	42
3.6.3.3	Transfecção	42
3.6.3.4	Análise da expressão proteica por Western blot	43
3.6.3.5	Avaliação da atividade da via da PKA.....	44
3.7	Análise Estatística.....	45

4	RESULTADOS.....	46
4.1	Investigação de Variantes Somáticas em Hiperplasias Adrenais Corticais Unilaterais e Bilaterais	47
4.2	Achados da Análise do Exoma	48
4.2.1	Análise das variantes germinativas em genes relacionados à via da PKA.....	50
4.2.1.1	Variantes germinativas em genes da família das fosfodiesterases.....	50
4.2.1.2	Variante germinativa no gene codificador da subunidade α s da proteína G	55
4.2.2	Análise das variantes germinativas em canais de cálcio em pacientes com HU	57
4.2.2.1	Gene <i>CACNA1I</i> : c.6388C>A; p.Leu2095Ile.....	57
4.2.2.2	Gene <i>CACNA1H</i> : c.5428-3C>T.....	58
4.3	Avaliação Imunohistoquímica	59
4.4	Estudos Funcionais	61
4.4.1	Atividade da PKA em tecido adrenal congelado	61
4.4.2	Avaliação da expressão gênica do <i>SGK1</i>	62
4.4.3	Avaliação funcional das variantes na <i>PDE2A</i> e <i>PDE3B</i> <i>in vitro</i>	63
4.4.4	Compilação das características clínicas dos pacientes com os achados da imunohistoquímica e sequenciamento exômico.....	68
5	DISCUSSÃO.....	70
6	CONCLUSÕES	79
7	ANEXOS	81
8	REFERÊNCIAS	92
	<u>APÊNDICE</u>	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	- Aldosterona
AA	- Aminoácido
ABraOM	- Arquivo Brasileiro Online de Mutações
ACMG-AMP	- <i>American of Medical Genetics and Genomics e Association for Molecular Pathology</i>
ACTH	- Hormônio adrenocorticotrópico
AMPc	- Adenosina monofosfato cíclico
ANP	- Peptídeo natriurético atrial
AP	- Anatomopatológico
APR	- Atividade plasmática de renina
<i>ATP1A1</i>	- Gene que codifica a subunidade $\alpha 1$ do canal Na^+/K^+ -ATPase
<i>ATP2B3</i>	- Gene que codifica o canal Ca^{2+} -ATPase
AVC	- Acidente vascular cerebral
BAM	- <i>Binary alignment map</i>
Ca^{2+}	- Cálcio
<i>CACNA1D</i>	- Gene que codifica a subunidade $\alpha 1D$ do canal de cálcio $\text{Ca}_v1.3$
<i>CACNA1H</i>	- Gene que codifica a subunidade $\alpha 1H$ do canal de cálcio $\text{Ca}_v3.2$
<i>CACNA1I</i>	- Gene que codifica a subunidade $\alpha 1I$ do canal de cálcio $\text{Ca}_v3.3$
CAPPesq	- Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cDNA	- Fita complementar de DNA
Cl^-	- Cloro
<i>CLCN2</i>	- Gene que codifica o canal de cloro ClC-2
CNV	- Variação do número de cópias (<i>Copy-number variation</i>)
<i>CTNNB1</i>	- Gene que codifica a proteína β -catenina
CVA	- Cateterismo das veias adrenais
<i>CYP11B1</i>	- Gene que codifica a enzima 11- β -hidroxilase tipo 1
<i>CYP11B1/B2</i>	- Gene quimérico formado pela região promotora do gene <i>CYP11B1</i> e região codificadora do gene <i>CYP11B2</i>
<i>CYP11B2</i>	- Gene que codifica a enzima aldosterona sintase
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
dNTP	- Desoxinucleotídeo trifosfato
ENaC	- Expressão do canal de sódio epitelial
ENSAT	- Rede europeia para estudo dos tumores corticais adrenais
EV	- <i>Empty vector</i>
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GMPc	- Guanosina monofosfato cíclico

<i>GNAS</i>	- Gene que codifica a subunidade α s da proteína G estimulatória de adenilatociclase
GnomAD	- <i>Genome Aggregation Database</i>
GTEX	- <i>Genotype-Tissue Expression</i>
HA	- Hipertensão arterial
HB	- Hiperplasia adrenal cortical bilateral
HE	- Hipertensão arterial sistêmica essencial
HF	- Hiperaldosteronismo familiar
HP	- Hiperaldosteronismo primário
HU	- Hiperplasia adrenal cortical unilateral
IGV	- <i>Integrative Genomics Viewer</i>
IHQ	- Imunohistoquímica
K ⁺	- Potássio
<i>KCNJ5</i>	- Gene que codifica o canal de potássio GIRK 4
LOH	- Perda de heterozigose
MAF	- <i>Minor Allele Frequency</i> (frequência alélica mínima)
Na ⁺	- Sódio
OMIM	- <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PA	- Pressão arterial
PCR	- Reação em cadeia de polimerase
<i>PDE1A</i>	- Gene que codifica a fosfodiesterase 1A
<i>PDE2A</i>	- Gene que codifica a fosfodiesterase 2A
<i>PDE3B</i>	- Gene que codifica a fosfodiesterase 3B
PDEs	- Fosfodiesterases
PKA	- Proteína quinase A
PKG	- Proteína quinase G
R	- Concentração de renina direta
RNA	- Ácido ribonucleico
RT	- Transcrição reversa
SCNN1G	- Subunidade gama do canal epitelial de sódio
SELA	- Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala da FMUSP
SGK1	- Gene que codifica a quinase 1 regulada por glicocorticoide
SPLE	- Sequenciamento paralelo em larga escala
TC	- Tomografia computadorizada
VCF	- <i>Variant Call Format</i>
VP	- Variante patogênica
VUS	- Variante de significado incerto
WT	- <i>Wild type</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Morbimortalidade cardiovascular nos pacientes com hiperaldosteronismo primário (HP) e hipertensão essencial (HE).....	3
Tabela 2 - Frequência dos subtipos de hiperaldosteronismo primário	5
Tabela 3 - Frequência de variantes patogênicas somáticas em 474 aldosteronomas da Rede Europeia para Estudo dos Tumores Adrenais Corticais (ENSAT) ⁴⁸	15

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma para investigação diagnóstica do hiperaldosteronismo primário	4
Figura 2 - Célula glomerulosa em repouso e estimulada por angiotensina II ou hipercalcemia	9
Figura 3 - Representação esquemática dos canais iônicos presentes na membrana das células da zona glomerulosa	10
Figura 4 - Diagnóstico do hiperaldosteronismo familiar tipo I ou supressível por glicocorticoide.....	12
Figura 5 - Processo de filtragem das variantes germinativas identificadas no <i>Freebayes</i> que foram anotadas utilizando o <i>Annovar</i>	35
Figura 6 - Processo de filtragem das variantes somáticas identificadas no <i>Lancet</i> que foram anotadas utilizando o <i>Annovar</i>	35
Figura 7 - Cobertura vertical das corridas de exoma	37
Figura 8 - Eletroferogramas obtidos por meio do sequenciamento pelo método Sanger de duas hiperplasias adrenais corticais bilaterais, mostrando as variantes patogênicas somáticas p.Gly151Arg (A) e p.Leu168Arg (B) no gene <i>KCNJ5</i>	47
Figura 9 - Eletroferograma da variante p.Ala59Val da <i>PDE1A</i> obtido através do sequenciamento pelo método Sanger.....	51
Figura 10 - Segregação familiar e eletroferograma da variante p.Ile629Val da <i>PDE2A</i>	52
Figura 11 - Eletroferograma da variante p.Arg217Gln da <i>PDE3B</i> obtido através de sequenciamento pelo método Sanger	54
Figura 12 - Segregação familiar e eletroferograma da variante p.Gly392Val da <i>PDE3B</i>	55
Figura 13 - Segregação familiar e eletroferograma da variante p.Arg14Leu do <i>GNAS</i>	56
Figura 14 - Eletroferograma da variante p.Leu2095Ile do <i>CACNA1I</i> obtido através de sequenciamento pelo método Sanger	58
Figura 15 - Eletroferograma da variante c.5428-3C>T do <i>CACNA1H</i> obtido através de sequenciamento pelo método Sanger	59

Figura 16 - Expressão da CYP11B2 na zona glomerulosa normal (A), hiperplasia adrenal cortical bilateral (B, Caso 4 do Quadro 3) e aldosteronoma (C).....	60
Figura 17 - Expressão da PDE2A na zona glomerulosa normal (A), hiperplasia adrenal cortical bilateral (B, Caso 4 do Quadro 3) e aldosteronoma (C).....	61
Figura 18 - Confirmação da introdução da variante p.Ile629Val no vetor <i>PDE2A</i> humano WT por Sanger (A). Avaliação densitométrica da expressão proteica da PDE2A (B).....	64
Figura 19 - Confirmação por Sanger da introdução das variantes p.Arg217Gln (A) e p.Gly392Val (B) no vetor <i>PDE3B</i> humano WT. Avaliação densitométrica da expressão proteica da PDE3B (C)	64
Figura 20 - Expressão proteica de SGK1	67
Figura 21 - Expressão proteica da SCNN1G após a transfecção com o mutante p.Ile629Val <i>PDE2A</i> (A) e com os mutantes p.Arg217Gln e p.Gly392Val da <i>PDE3B</i> (B) em células HEK 293T	67
Figura 22 - Expressão tecidual das PDEs. Adaptado de Azevedo <i>et al.</i> ⁶¹	72
Figura 23 - Estrutura molecular das PDEs. Adaptado de Zoraghi <i>et al.</i> ⁶⁹	73
Figura 24 - Representação esquemática da sinalização e regulação dos nucleotídeos cíclicos (AMPC e GMPc)	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Defeitos genéticos germinativos no hiperaldosteronismo familiar	11
Quadro 2	Caracterização dos 5 casos de hiperaldosternismo primário por hiperplasia adrenal cortical unilateral	22
Quadro 3	Caracterização dos 6 casos de hiperaldosternismo primário por hiperplasia adrenal cortical bilateral	23
Quadro 4	Oligonucleotídeos utilizados para sequenciar as regiões <i>hot-spot</i> dos genes <i>KCNJ5</i> , <i>ATP1A1</i> , <i>ATP2B3</i> a partir de cDNA; e dos genes <i>KCNJ5</i> e <i>CTNNB1</i> a partir de DNA genômico.....	27
Quadro 5	Escala semiquantitativa para a expressão proteica por imunohistoquímica.....	39
Quadro 6	Oligonucleotídeos utilizados na mutagênese dos genes <i>PDE2A</i> e <i>PDE3B</i>	41
Quadro 7	Análise das variantes germinativas selecionadas a partir do sequenciamento exômico	49
Quadro 8	Avaliação imunohistoquímica para PDE2A e CYP11B2 nas hiperplasias adrenais corticais unilaterais e bilaterais.....	60
Quadro 9	Compilação dos resultados dos cinco casos de hiperaldosternismo primário por hiperplasia adrenal cortical unilateral.....	68
Quadro 10	Compilação dos resultados dos seis casos de hiperaldosternismo primário por hiperplasia adrenal cortical bilateral	69

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Atividade da PKA em aldosteronomas com variante patogênica no *KCNJ5* e em hiperplasias adrenais corticais unilaterais e bilaterais. *, $p < 0,05$ comparado à adrenal normal 62
- Gráfico 2 - Expressão gênica do *SGK1* em hiperplasias adrenais corticais bilaterais e aldosteronomas. *, $p < 0,05$ comparado aos aldosteronomas..... 63
- Gráfico 3 - Atividade da via da PKA após indução pelo AMPc nas células transfectadas com o mutante Ileu629Val da *PDE2A* 65
- Gráfico 4 - Atividade da via da PKA após indução pelo AMPc nas células transfectadas com os mutantes Arg217Gln e Gly329Val da *PDE3B*..... 66

RESUMO

Rassi-Cruz M. *Investigação genética por sequenciamento paralelo em larga escala do hiperaldosteronismo primário causado por hiperplasia adrenal cortical unilateral ou bilateral* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introdução: O hiperaldosteronismo primário (HP) é a forma mais comum de hipertensão arterial (HA) endócrina com prevalência estimada de aproximadamente 4% em hipertensos atendidos em serviços de atenção primária e de 10% em pacientes referenciados para hospitais terciários. As causas mais frequentes de HP são hiperplasia adrenal cortical bilateral (HB) e aldosteronomas. A hiperplasia adrenal cortical unilateral (HU) é uma causa mais rara de HP, assim como as formas familiares. Na última década, foram feitos consideráveis avanços na patogênese do HP. Variantes patogênicas (VP) somáticas nos genes *KCNJ5*, *CACNA1D*, *ATP1A1*, *ATP2B3* e *CTNNB1* foram descritos em aldosteronomas. Entre as formas familiares de HP, VPs germinativas no *KCNJ5*, *CACNA1D*, *CACNA1H* e *CLCN2* foram identificadas em indivíduos com diagnóstico de HP precoce. No entanto, os defeitos genéticos implicados na patogênese do HP causado por HU ou HB em adultos permanecem pouco elucidados. **Objetivos:** Investigar as bases genéticas do HP causado por HU ou HB. Os objetivos específicos foram: 1) Investigar VPs somáticas nos genes *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* e *CTNNB1* em HU ou HB de indivíduos com HP; 2) Sequenciar o exoma (DNA periférico e do tecido adrenal) dos casos de HU ou HB; 3) Validar e realizar o estudo funcional das novas variantes genéticas encontradas no sequenciamento exômico. **Métodos:** Foram incluídos 11 pacientes com HP causado por hiperplasia adrenal (5 HU e 6 HB). A presença do gene quimérico *CYP11B1/CYP11B2* foi descartada em todos os casos. Em seguida, realizamos o sequenciamento paralelo em larga escala (HiSeq 2500, *Illumina*), pareado sangue e tecido adrenal, de 5 indivíduos com HP por HU e 6 com HP por HB. Todos os tecidos hiperplásicos apresentaram imunohistoquímica (IHQ) positiva para CYP11B2. Em relação aos achados do exoma, foi feita uma busca por variantes germinativas raras (MAF <0.01% no gnomAD) em genes codificadores de canais iônicos expressos em tecido adrenal normal ou previamente relacionados com hiperplasia adrenal (como as fosfodiesterases, PDEs). **Resultados:** Dois casos de HB apresentaram VPs somáticas no *KCNJ5* previamente descritas (p.Gly151Arg e p.Leu168Arg). Variantes germinativas em heterozigose e patogênicas *in silico* foram identificadas em genes codificadores de PDEs: 1) A variante p.Ala59Val na *PDE1A* em uma paciente com HU; 2) A variante p.Ile629Val na *PDE2A* em uma paciente com HB; 3) As variantes p.Arg217Gln *PDE3B* e p.Gly392Val na *PDE3B* em dois pacientes com HB. A atividade da PKA foi maior no tecido adrenal hiperplásico das pacientes com as variantes p.Ile629Val na *PDE2A* e p.Gly392Val na *PDE3B* quando comparada à adrenal normal. A expressão da PDE2A por imunohistoquímica foi

forte na zona glomerulosa normal e nódulos hiperplásicos de pacientes com HB. Estudos *in vitro* em células HEK 293T mostraram redução da expressão da PDE2A mutante em comparação às células transfectadas com PDE2A WT. De forma similar, as variantes na *PDE3B* (p.Arg217Gln e p.Gly392Val) reduziram a expressão proteica da PDE3B *in vitro*. Além disso, as variantes da *PDE2A* e *PDE3B* promoveram um aumento da expressão da SGK1 e/ou SCCN1G/ENaCg a nível de RNAm ou proteico, que são os principais mediadores da sinalização da aldosterona. Dentre os pacientes com HU, uma nova variante germinativa em heterozigose (c.5428-3C>T) no *CACNA1H* foi identificada em um caso. Adicionalmente, uma variante germinativa rara em heterozigose e patogênica *in silico* p.Leu2095Ile no *CACNA1I*, que codifica a subunidade α 1I do canal Ca_v 3.3, foi identificada em um paciente com HU. **Conclusões:** Variantes germinativas raras e provavelmente patogênicas foram identificadas nos genes da *PDE2A* e *PDE3B* em pacientes com HB, expandido o espectro de etiologias genéticas para o HP. Adicionalmente, uma variante germinativa rara e patogênica *in silico* no *CACNA1I* foi identificada em um paciente com HU associada ao HP.

Descritores: Hiperaldosteronismo; Hipertensão; Hiperplasia adrenal; Genética; Fosfodiesterases; Canais iônicos.

ABSTRACT

Rassi-Cruz M. *Genetic investigation by next generation sequencing of primary aldosteronism caused by unilateral or bilateral adrenal hyperplasia* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

Introduction: Primary aldosteronism (PA) is the most common form of endocrine arterial hypertension with an estimated prevalence of approximately 4% in hypertensives treated in primary care services and 10% in patients referenced to tertiary hospitals. The most frequent causes of PA are bilateral adrenal hyperplasia (BH) and aldosteronomas. Unilateral adrenal hyperplasia (UH) is a rare cause of PA, as well as familial PA. In the past few years, considerable advances have been made towards the pathogenesis of primary aldosteronism (PA). Somatic pathogenic variants in *KCNJ5*, *CACNA1D*, *ATP1A1*, *ATP2B3* and *CTNNB1* genes were identified in aldosteronomas. Among familial PA, germline defects in *KCNJ5*, *CACNA1D*, *CACNA1H* and *CLCN2* were identified in PA patients with early onset of PA. Despite the advances made towards the better understanding of PA pathogenesis, the genetic factors involved in PA caused by UH and BH in adults remain poorly elucidated. **Aim:** To search for new susceptibility genes in patients with PA caused by UH or BH. The specific aims of this study were: 1) To investigate somatic variants in *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* and *CTNNB1* genes in PA caused by UH or BH; 2) To perform exome sequencing (paired blood and adrenal tissue) of PA patients caused by UH or BH; 3) Validate and perform functional studies of genetic variants in new candidate genes. **Methods:** We included 11 patients with PA caused by adrenal hyperplasia (5 UH and 6 BH). The presence of chimeric *CYP11B1/CYP11B2* gene was ruled out in all cases. Then, we performed whole exome sequencing (HiSeq 2500, *Illumina*) in paired blood and adrenal tissue from five patients with UH and six with BH. All hyperplastic tissues were positive for CYP11B2 staining. We searched for rare germline coding variants (MAF <0.01% in gnomAD) in ion-channel genes expressed in normal adrenal or in those previously associated with adrenal hyperplasia (such as phosphodiesterases, PDEs). **Results:** Somatic pathogenic variants in *KCNJ5* previously described (p.Gly151Arg e p.Leu168Arg) were identified in 2 BHs. Interestingly, we also identified 4 germline heterozygous variants predicted to be pathogenic *in silico* in PDEs genes: 1) The p.Ala59Val in *PDE1A* in a patient with UH; 2) The p.Ile629Val in *PDE2A* in a patient with BH; and 3) The p.Arg217Gln and p.Gly392Val variants in *PDE3B* in two patients with BH. Next, PKA activity was analyzed in frozen tissue. PKA activity was increased in adrenal hyperplastic tissue from patients with germline variants p.Ile629Val *PDE2A* and p.Gly392Val *PDE3B* compared to normal adrenal. *PDE2A* staining was strong in zona glomerulosa and in nodules of hyperplastic areas. *In vitro* studies showed that *PDE2A* expression was decreased in HEK 293T cells transfected with p.I629V *PDE2A* vector compared to those transfected with WT

PDE2A vector. Similarly, PDE3B expression was decreased in cells transfected with p.Arg217Gln or p.Gly392Val *PDE3B* vector. Additionally, *PDE2A* and *PDE3B* variants increased gene and/or protein expression of SGK1 and SCNN1G/ENaCg, downstream mediators of aldosterone signaling. Regarding patients with UH, we identified a novel germline heterozygous variant (c.5428-3C>T) in *CACNA1H* gene in one patient with UH. In addition, a rare missense heterozygous variant predicted to be pathogenic *in silico* (p.Leu2095Ile) in *CACNA1I* gene, which encodes the α 1I subunit of Ca_v 3.3 channel, was identified in a patient with UH. **Conclusions:** This evidence suggest that *PDE2A* and *PDE3B* variants might be involved with the pathogenesis of BH and expand the spectrum of genetic etiologies for PA. In addition, a rare germline and pathogenic *in silico* variant in *CACNA1I* was identified in a patient with PA caused by UH.

Descriptors: Primary aldosteronism; Hypertension; Adrenal hyperplasia; Genetics; Phosphodiesterases; Ion channels.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hiperaldosteronismo Primário (HP)

A hipertensão arterial (HA) representa o principal fator de risco independente para morte prematura, afetando cerca de 10 a 40% da população mundial^{1,2}. O hiperaldosteronismo primário é a causa mais frequente de HA secundária de causa endócrina, sendo a forma curável mais comum de HA. O HP apresenta prevalência de aproximadamente 4% em hipertensos atendidos em serviços de atenção primária, 10% em pacientes referenciados para hospitais terciários, chegando a 21% em pacientes com HA resistente³⁻⁶. A HA resistente é caracterizada pela ausência de controle pressórico apesar do uso de três ou mais drogas anti-hipertensivas em doses máximas toleradas (preferencialmente um diurético) ou pela necessidade de quatro ou mais medicamentos na vigência de um controle pressórico adequado⁷.

O HP é caracterizado por uma produção autônoma de aldosterona, independente do sistema renina-angiotensina ou dos níveis de potássio (K^+). Como consequência, ocorre retenção de sódio, supressão da renina plasmática, elevação da pressão arterial (PA), aumento da excreção de K^+ e lesão cardiovascular⁸. Isso porque, o excesso de aldosterona exerce efeitos cardiovasculares independentes dos níveis pressóricos, resultando em maior morbimortalidade cardiovascular nos pacientes com HP quando comparados com pacientes hipertensos essenciais pareados por idade, sexo e gravidade da HA^{9,10} (Tabela 1).

De acordo com as recomendações do último consenso da Sociedade Americana de Endocrinologia (*The Endocrine Society*) para o diagnóstico e

tratamento dos pacientes com HP, as indicações de rastreamento de HP em pacientes hipertensos são: a) HA e hipocalemia espontânea ou induzida por terapia com diurético; b) HA e incidentaloma adrenal; c) PA>150x100 mmHg em três ocasiões diferentes; d) HA (PA $\geq$ 140/90) não controlada com três ou mais drogas anti-hipertensivas convencionais, incluindo-se preferencialmente um diurético (HA resistente); e) HA controlada (<140x90 mmHg) com quatro drogas anti-hipertensivas (HA resistente); f) HA associada à apneia obstrutiva do sono; g) HA e história familiar de HA ou doença cerebrovascular em indivíduo jovem (<40 anos); h) HA em parentes de primeiro grau de pacientes com HP⁸.

Tabela 1 - Morbimortalidade cardiovascular nos pacientes com hiperaldosteronismo primário (HP) e hipertensão essencial (HE)

Eventos cardiovasculares	HP%	HE%	P
<i>Fibrilação atrial</i> ¹¹	3,9	1,1	0,001
<i>Doença arterial coronariana</i> ¹¹	5,7	2,8	0,03
<i>Insuficiência cardíaca</i> ¹¹	4,1	1,2	0,003
<i>Infarto agudo do miocárdio</i> ¹¹	4,4	1,7	0,01
<i>Acidente vascular cerebral</i> ¹²	7,4	3,5	0,006
Alterações metabólicas			
<i>Síndrome Metabólica</i> ¹³	41,1	29,6	0,05
<i>Metabolismo anormal da glicose</i> ^{14 #}	22,4	16,8	0,04

[#]Metanálise

O rastreio inicial do HP deve ser feito com dosagem de aldosterona (A) e renina (R) plasmáticas após o paciente ter deambulando por no mínimo 2 horas e estar sentado por 5 a 15 minutos (Figura 1). Deve-se corrigir a hipocalemia antes da realização do exame e recomenda-se não restringir o sal da dieta. Caso a renina seja dosada diretamente, deve-se dividir o valor encontrado por 12, para converter para atividade plasmática de renina (APR)⁸. Resultados de aldosterona $\geq$ 10 ng/dL com uma relação

$A/APR \geq 30$ ng/dL/ng/mL/h ou $A/R \geq 2,0$ conferem uma sensibilidade e especificidade superiores a 90% para o diagnóstico de HP^{8,15}. Para evitar resultados falso negativos, deve-se suspender diuréticos e espironolactona por no mínimo de 4 a 6 semanas.

Figura 1 - Fluxograma para investigação diagnóstica do hiperaldosteronismo primário. A, aldosterona; R, concentração de renina direta; APR, atividade plasmática de renina; TC, tomografia computadorizada. Adaptado de Vilela *et al.*¹⁶

Existem vários testes confirmatórios disponíveis e a escolha depende da experiência de cada serviço¹⁷. No Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), optou-se por iniciar com o teste da furosemida ou da infusão salina na posição sentada¹⁶. Após confirmação diagnóstica de HP, todos os pacientes devem ser submetidos a tomografia computadorizada (TC) de adrenais para determinação etiológica e exclusão de carcinoma cortical adrenal⁸. A TC de adrenais apresenta acurácia limitada. Adenomas corticais adrenais produtores de aldosterona (aldosteronomas) pequenos (<1 cm) podem não ser detectados pelo método. Por outro lado, alterações bilaterais não necessariamente representam hiperplasia

bilateral. É possível haver associação de aldosteronoma e incidentaloma adrenal não funcionante contralateral, principalmente em pacientes >40 anos⁸. Recomenda-se que a TC seja realizada com cortes finos e contraste, quando não houver contraindicação. Isso permite a avaliação da anatomia das veias adrenais, necessária quando houver indicação de cateterismo de veias adrenais (CVA) (Figura 1).

As principais etiologias do HP são: hiperplasia adrenal cortical bilateral (HB) ou hiperaldosteronismo idiopático e aldosteronomas (Tabela 2)¹⁸. O hiperaldosteronismo idiopático é causado por HB da zona glomerulosa cortical, sendo responsável por 50% a 60% dos casos de HP. Na TC é caracterizado por glândulas adrenais normais, espessamento bilateral ou alterações assimétricas (nódulo e espessamento). Os aldosteronomas são adenomas medindo usualmente entre 1-3 cm e representam 40% a 50% dos casos de HP^{8,18}. Os aldosteronomas podem ser <1cm e não visualizados na TC. O carcinoma cortical adrenal é uma causa bastante rara de HP e deve ser suspeitado em pacientes com HP e massa adrenal >4 cm¹⁸. Hiperplasia adrenal cortical unilateral (HU) e as formas familiares de HP são causas raras, correspondendo a <1% dos casos¹⁸.

Tabela 2 - Frequência dos subtipos de hiperaldosteronismo primário

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

Segundo o consenso para diagnóstico e tratamento do HP da Sociedade Americana de Endocrinologia, não é necessária a realização de CVA em pacientes jovens (<35 anos), com hipocalcemia espontânea, elevação importante da aldosterona e lesões adrenais unilaterais na TC compatíveis com adenoma⁸. Na instituição do presente estudo, a indicação de CVA não é baseada na idade do diagnóstico de HP. Considerou-se a idade do diagnóstico da HA, uma vez que o tempo médio de HA antes do diagnóstico de HP é de aproximadamente 15 anos. Assim, o CVA está indicado nas seguintes situações: a) TC de adrenais normal; b) TC de adrenais com espessamento ou nódulos bilaterais; c) Lesão adrenal unilateral em pacientes com diagnóstico de HA após 40 anos, devido a maior prevalência de incidentaloma adrenal nesta faixa etária. O CVA é realizado conforme o protocolo descrito no Anexo A.

A investigação de hiperaldosteronismo familiar (HF) está indicada em pacientes jovens (<20 anos) com diagnóstico de HP, e naqueles com HA e história familiar de HP ou acidente vascular cerebral (AVC) hemorrágico em idade <40 anos. As formas de HF inicialmente investigadas são: HP familiar tipo I (hiperaldosteronismo supressível por glicocorticóides) e tipo III (causado por variantes germinativas no gene *KCNJ5*)⁸.

O tratamento do HP causado por produção unilateral (aldosteronoma ou hiperplasia adrenal cortical unilateral [HU]) consiste em adrenalectomia laparoscópica. Já a HB, é tratada com antagonista de mineralocorticoide (espironolactona ou eplerenona). Tanto o tratamento cirúrgico quanto o medicamentoso estão associados à redução da morbidade cardiovascular causada pelo excesso de aldosterona e redução da massa ventricular esquerda após 6 anos de seguimento^{19,20}.

Antes da adrenalectomia unilateral, deve-se iniciar antagonista de mineralocorticoide com objetivo de desbloquear a renina e evitar, assim, o hipoaldosteronismo hiporreninêmico no pós-operatório. No pós-operatório imediato já se observa redução importante da aldosterona, normalização do potássio sérico e desbloqueio da renina em graus variáveis⁸.

Após adrenalectomia unilateral, a cura bioquímica do HP é definida pelo desbloqueio da renina, correção da hipocalemia e aldosterona usualmente <10 ng/dL, com normalização da relação Aldo/Renina²¹. Para os pacientes com aldosterona ≥ 10 ng/dL e relação Aldo/Renina ≥ 2 , está indicada a realização de um teste confirmatório para exclusão de HP²¹. A cura do HP impacta significativamente no controle pressórico, porém o sucesso clínico completo (definido como a PA $<140 \times 90$ mmHg sem uso de medicações anti-hipertensivas) é observado em cerca de 50% (variação de 35% a 80%) dos pacientes⁸. História familiar de HA essencial e um longo período de HA antes do diagnóstico de HP estão associados com ausência de remissão da HA no pós-operatório^{22,23}. Na instituição onde foi realizado o presente estudo, a taxa de remissão da HA após adrenalectomia é 37%. Na coorte de pacientes com HP unilateral, somente a presença de variante patogênica (VP) somática no *KCNJ5* foi um preditor independente de remissão completa da HA após adrenalectomia unilateral²⁴.

O tratamento medicamentoso com espironolactona ou eplerenona é indicado para os casos de HP bilateral. A espironolactona (50-400 mg/d) é a única medicação disponível no Brasil e tem como objetivo controlar a PA, normalizar os níveis séricos de potássio e desbloquear a renina²⁵. A espironolactona é também um antagonista do receptor androgênico, podendo causar ginecomastia e redução da libido em homens⁸.

Em pacientes com doença renal crônica em estágio ≥ 3 ou em pacientes idosos, deve-se ter cautela no uso de antagonista de mineralocorticoide, já que há risco de hipercalcemia e piora da função renal. A eplerenona é um antagonista seletivo de mineralocorticoide, tendo, portanto, menos efeitos colaterais pela ausência de ação anti-androgênica. A dose inicial de eplerenona é 25 mg 2x/dia, podendo chegar a 50 mg 2x/dia²⁶. O alvo principal do tratamento medicamentoso deve ser o desbloqueio da renina, já que uma APR >1 ng/mL/h foi associada a redução da incidência cumulativa de eventos cardiovasculares²⁷.

1.2 Aspectos Genéticos do HP

A ativação da via de sinalização dependente de cálcio (Ca^{2+}) tem um papel central na regulação da produção de aldosterona, especificamente aumentando a expressão do gene *CYP11B2*. As células da zona glomerulosa são sensíveis às variações na concentração extracelular de K^+ . Elas apresentam uma alta condutância de K^+ em repouso, resultando em um potencial de membrana altamente negativo. A despolarização destas células, seja pelo aumento da concentração extracelular de K^+ ou pelo fechamento dos canais de K^+ pela angiotensina II, promove a ativação dos canais de cálcio voltagem-dependentes e aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular, estimulando assim a síntese de aldosterona e proliferação celular (Figura 2)^{28,29}.

Figura 2 - Célula glomerulosa em repouso e estimulada por angiotensina II ou hipercalemia. A, Célula da zona glomerulosa não estimulada. B, Célula da zona glomerulosa estimulada pela angiotensina II ou pelo aumento da concentração extracelular de potássio (K^+). O estímulo promove o fechamento dos canais de K^+ com despolarização da membrana, ativação dos canais de cálcio (Ca^{2+}) voltagem-dependentes, aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular e estímulo para síntese de aldosterona. Adaptado de Choi *et al.*³⁰

A identificação de defeitos genéticos em canais iônicos que controlam o potencial de despolarização da membrana plasmática das células da zona glomerulosa e, consequentemente, a secreção de aldosterona, permitiram uma maior compreensão da genética molecular relacionada ao desenvolvimento do HP (Figura 3)²⁸.

Figura 3 - Representação esquemática dos canais iônicos presentes na membrana das células da zona glomerulosa. Variantes patogênicas (VPs) em genes que codificam canais iônicos levam à alteração da atividade dos canais, o que promove despolarização crônica da membrana plasmática, aumento do cálcio (Ca^{2+}) intracelular e estímulo para a secreção autônoma de aldosterona. VPs no gene *KCNJ5* levam à alteração do canal de potássio (K^{+}) GIRK4, com perda da seletividade do canal ao K^{+} . VPs no gene *ATP1A1* promovem redução da atividade da bomba $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase. VPs no gene *ATP2B3* causam redução da atividade do canal Ca^{2+} -ATPase responsável pelo efluxo de Ca^{2+} da célula. VPs no gene *CACNA1D* e *CACNA1H* promovem aumento da atividade do canal de Ca^{2+} voltagem-dependente responsável pelo influxo de Ca^{2+} na célula. Adaptado de Zennaro *et al.*²⁸

1.2.1 Hiperaldosteronismo familiar

Até o momento foram descritos quatro subtipos de HF (Quadro 1)³¹. A primeira descrição do HF tipo I foi publicada em 1966, mas, somente em 1992, foi descoberto que esta forma familiar é causada por uma duplicação gênica que decorre de um emparelhamento desigual durante o *crossing-over*, levando à formação de um gene quimérico (Figura 4) constituído pela região promotora da 11β-hidroxilase (*CYP11B1*) e pela região codificadora da aldosterona sintase (*CYP11B2*)^{32,33}. Como consequência, a síntese de aldosterona passa a ser regulada pelo hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e não pela angiotensina II. A apresentação clínica típica é de HA resistente em indivíduos com menos de 20 anos e história familiar de HA. O HF tipo I ou hiperaldosteronismo supressível por glicocorticoide é investigado com teste de supressão

prolongada com dexametasona (0,5 mg 6/6h por 48h). A supressão da aldosterona plasmática para níveis $\leq 4\text{ng/dL}$ sugere o diagnóstico, que deve ser confirmado com a pesquisa genética, através da demonstração do gene quimérico em gel de agarose após uma reação em cadeia de polimerase (PCR) longa³⁴. O tratamento é realizado com dexametasona em doses baixas (0,125-0,25 mg/d) com objetivo de suprimir o ACTH e bloquear a síntese de aldosterona. Se for necessário um fármaco adicional para controlar a PA ou normalizar os níveis de renina, pode-se adicionar um antagonista de mineralocorticoide^{35,36}.

Quadro 1 - Defeitos genéticos germinativos no hiperaldosteronismo familiar

Defeitos Germinativos	Variantes Germinativas	Idade ao diagnóstico
Gene quimérico <i>CYP11B1/CYP11B2</i> (supressível por glicocorticoide)		<20 anos
<i>KCNJ5</i> (codifica canal de K^+ GIRK4)	<i>Missense</i>	<10 anos
<i>CACNA1D</i> (variantes <i>de novo</i> em 2 crianças com HP e anormalidades neurológicas)	<i>Missense</i>	<10 anos
<i>CACNA1H</i>* (canal de Ca^{2+} Cav3.2)	<i>Missense</i>	<20 anos
<i>CLCN2</i>* (canal de Cl^- ClC2)	<i>Missense</i>	<20 anos

* Penetrância incompleta.

Figura 4 - Diagnóstico do hiperaldosteronismo familiar tipo I ou supressível por glicocorticoide. A, Representação esquemática do *crossing-over* desigual entre os genes *CYP11B1* e *CYP11B2* com formação do gene quimérico, constituído pela região promotora da 11 β -hidroxilase (*CYP11B1*) e pela região codificadora da aldosterona sintase (*CYP11B2*). B, Produto de reação de PCR longa para amplificação do gene quimérico em gel de agarose. HFI, Hiperaldosteronismo familiar tipo I

O HF tipo II consiste na presença de no mínimo dois familiares de primeiro grau com HP, cuja etiologia pode ser aldosteronoma ou hiperplasia adrenal cortical bilateral, sendo a apresentação clínica e bioquímica indistinguível das formas esporádicas^{31,37}. Em 2018, a etiologia do HF tipo II foi determinada^{38,39}. VPs germinativas em heterozigose no gene *CLCN2* foram identificadas em famílias com HP de início precoce (< 20 anos)³⁹. Este gene codifica o canal de cloro (Cl⁻) CIC-2 que é expresso na zona glomerulosa cortical. As seis VPs encontradas (p.Arg172Gln, p.Met22Lys, p.Tyr26Asn, p.Ser865Arg, p.Lys362del e p.Gly24Asp) são ativadoras, levando a um aumento da condutância de Cl⁻ pelo canal. Com isso, ocorre despolarização da membrana plasmática, resultando em aumento da expressão de *CYP11B2* e consequente estímulo para síntese de aldosterona. A transmissão é autossômica dominante com penetrância incompleta^{38,39}.

O HF tipo III foi descrito inicialmente em 2008 em indivíduos com HP de início na infância, com quadro de HA resistente, hipocalemia e hiperplasia macronodular adrenal bilateral⁴⁰. Em 2011, uma VP germinativa inativadora

(p.Thr158Ala) no gene *KCNJ5*, que codifica o canal de K^+ GIRK4 (Kir3.4), foi identificada em um paciente com HF tipo III³⁰. A VP identificada no filtro do canal de K^+ Kir3.4 leva à perda da seletividade do canal ao K^+ , com consequente aumento da condutância para o sódio (Na^+). O canal GIRK4, responsável pela manutenção do potencial de membrana da zona glomerulosa cortical, passa a funcionar como um canal de entrada de Na^+ para o citoplasma, promovendo a despolarização contínua da membrana e estímulo para síntese de aldosterona⁴¹. Posteriormente, outras VPs no *KCNJ5* com variabilidade fenotípica foram identificadas⁴¹⁻⁴³. As VPs germinativas p.Gly151Arg, p.Thr158Ala e p.Ile157Ser estão associadas a um fenótipo grave do HP com HA de início precoce e resistente ao tratamento medicamentoso, sendo a adrenalectomia bilateral às vezes necessária para o controle da PA⁴⁴. Por outro lado, as variantes p.Gly151Glu e p.Tyr152Cys foram associadas a um fenótipo mais leve, com fácil controle da PA e sem evidência de hiperplasia adrenal na TC^{29,41}. Todas as VPs descritas localizam-se próximo ou no filtro de seletividade do canal GIRK4.

O HF IV é uma forma rara causada por VPs germinativas ativadoras no gene *CACNA1H*. Em 2015, Scholl *et al.*⁴⁵ identificaram uma nova VP germinativa em heterozigose no *CACNA1H* (p.Met1549Val) em cinco pacientes com HP e HA antes dos 10 anos (herdada em três casos e *de novo* em dois pacientes). Este gene codifica a subunidade $\alpha 1$ do canal de Ca^{+2} voltagem-dependente (Cav3.2) do tipo T⁴⁵. A variante p.Met1549Val não se correlacionou com outras manifestações clínicas além do HP. Estudos *in vitro* revelaram que esta VP ativadora promove aumento do influxo de cálcio nas células da zona glomerulosa resultando em estímulo para síntese de aldosterona⁴⁶. Posteriormente, foram identificadas novas VPs no *CACNA1H* (p.Met1549Ile, p.Ser196Leu, p.Val1951Glu e p.Pro2083Leu) em pacientes com HF diagnosticado após os 20 anos e com padrão de penetrância incompleta⁴⁷.

1.2.2 Aldosteronomas

Em 2011, VPs somáticas no *KCNJ5* (p.Gly151Arg e p.Leu168Arg) foram identificadas em oito de 22 aldosteronomas (36%)³⁰. Estas variantes, também localizadas no filtro do canal de K⁺ GIRK4, levam à perda da seletividade deste canal ao K⁺ e aumento da condutância ao Na⁺³⁰. Em 2014, VPs somáticas no *KCNJ5* foram identificadas em 38% dos aldosteronomas da coorte da Rede Europeia para Estudo dos Tumores Adrenais Cortical (ENSAT)⁴⁸. As variantes p.Gly151Arg (c.451G>A ou c.451G>C) e p.Leu168Arg (c.503T>G) foram encontradas na quase totalidade dos casos. Duas outras VPs somáticas previamente descritas, p.Thy158Ala (c.472A>G) e p.Trp126Arg (c.376T>C), foram identificadas (Tabela 3)⁴⁸.

Em 2013, o gene *ATP1A1*, que codifica a subunidade $\alpha 1$ da bomba Na⁺/K⁺-ATPase, foi associado ao desenvolvimento de aldosteronomas^{49,50}. Na coorte da ENSAT, VPs somática no *ATP1A1* foram identificadas em 5,3% dos aldosteronomas: p.Leu104Arg (c.311T>G) em 17 casos; deleção p.Phe100_Leu104del (c.299_313TCTCAATGTTACTGT) em 5 casos; p.Gly99Arg (c.295G>A) em um caso e p.Val332Gly (c.995T>G) em dois casos⁴⁸. Estas variantes reduzem a atividade da bomba Na⁺/K⁺-ATPase e a afinidade ao K⁺, resultando em despolarização da membrana plasmática, com estímulo para produção de aldosterona^{49,50}.

Adicionalmente, VPs no gene *ATP2B3*, que codifica o canal Ca²⁺-ATPase, foram identificadas em aldosteronomas⁴⁹. Estas variantes levam à deleção de dois aminoácidos nas posições 425 e 426 (p.Leu425_Val426del), diminuindo a atividade desta bomba efluxora de cálcio. Com isso, ocorre aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ e aumento da síntese de aldosterona⁴⁹. Na coorte da ENSAT, VPs somáticas no *ATP2B3* foram identificadas em 1,7% dos aldosteronomas: a deleção

p.Leu425_Val426del (c.1272_1277delGCTGGT ou c.1273_1278delCTGGTC) em cinco casos; a deleção p.Val426_Val427del (c.1277_1282TCGTGG) em um caso; e uma variante nova p.Val424_Leu425del (c.1270_1275delGTGCTG) em dois casos⁴⁸. Nenhuma VP germinativa no *ATP1A1* e *ATP2B3* foi descrita até o momento.

Tabela 3 - Frequência de variantes patogênicas somáticas em 474 aldosteronomas da Rede Europeia para Estudo dos Tumores Adrenais Corticais (ENSAT)⁴⁸

Gene	Proteína	Loci	Hot-spot	Frequência de Mutações (%)
<i>KCNJ5</i>	GIRK4 (Canal de K ⁺)	11q24.3	Exon 2	38
<i>CACNAID</i>	Cav1.3 (Canal de Ca ²⁺)	3p21.1	Não tem	9,3
<i>ATP1A1</i>	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase (Bomba ATPase)	1p13.1	Exons 4 e 8	5,3
<i>ATP2B3</i>	Ca ²⁺ -ATPase (Bomba ATPase)	Xq28	Exon 8	1,7
<i>CTNNB1</i>	B-catenina	3p22.1	Exon 3	NA
Total				54

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

Em 2013, Scholl *et al.*⁵¹ identificaram VPs somáticas (quatro alterando a Gly403 e uma alterando a Ile770) no gene *CACNAID* em aldosteronomas. Este gene codifica a subunidade α 1D do canal de Ca²⁺ voltagem-dependente Cav1.3 do tipo L (longa duração). As alterações encontradas resultam em ativação do canal de Ca²⁺ em potenciais de despolarização mais baixos, resultando no aumento do influxo de Ca²⁺, aumento da produção de aldosterona e proliferação das células da glomerulosa⁵¹. Na coorte da ENSAT, VPs somáticas no *CACNAID* foram identificadas em 9,3% dos aldosteronomas⁴⁸. Ao contrário dos genes *KCNJ5*, *ATP1A1* e *ATP2B3*, não foram descritas áreas *hot-spot* para o *CACNAID*.

Além de ter um papel na tumorigênese dos carcinomas corticais adrenais⁵², VPs somáticas ativadoras no exon 3 da *CTNNB1* foram identificadas em aldosteronomas^{53,54}. A via Wnt/ β -catenina constitui uma via fundamental no desenvolvimento e manutenção do córtex adrenal, regulando o crescimento e a diferenciação celular⁵⁵. Åkerström *et al.*⁵⁴ identificaram VPs somáticas no *CTNNB1* em 5% dos aldosteronomas sem VPs no *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* e *CACNAID*.

1.2.3 Hiperplasia adrenal cortical unilateral e bilateral

Em 2015, VPs germinativas no gene *ARMC5* (*Armadillo repeat containing 5*), identificado como novo gene supressor tumoral, foram identificadas em seis afro-americanos com HP (um aldosteronoma, dois casos de HU e três casos de HB)⁵⁶. As variantes identificadas foram: p.Leu156Phe, p.Thr643Met, p.Pro826His, p.Arg898Trp, c.583+26G>T e c.1370-3C>A. Três dessas variantes (p.Leu156Phe, p.Thr643Met e p.Arg898Trp) foram previamente identificadas em pacientes com hiperplasia macronodular adrenal primária e hipercortisolismo⁵⁶. O único estudo que associou as variantes no *ARMC5* ao HP não utilizou sequenciamento paralelo em larga escala⁵⁶. Dessa forma, não se pode excluir que os pacientes com HP e variantes no *ARMC5* tenham VPs em outros genes candidatos. Adicionalmente, esse achado não foi reproduzido em nenhum estudo genômico em larga escala de HP^{38,39,49,50}.

Em 2013, Scholl *et al.*⁵¹ descreveram duas VPs germinativas *de novo* no *CACNAID* (p.Gly403Asp e p.Ile770Met) em duas crianças com HP diagnosticado antes dos 10 anos associado à anormalidades neuromusculares⁵¹. Posteriormente, VPs somáticas no *CACNAID* (Gly403Arg e Phe767Val) foram identificadas na HU de dois pacientes com HP⁵⁷.

Em 2017, Yamazaki *et al.*⁵⁸ realizaram análise genética a partir do ácido desoxirribonucleico (DNA) obtido de microdissecção de 26 micronódulos com imunohistoquímica positiva para CYP11B2 de cinco casos de HU: 17 micronódulos com VP somática no *CACNA1D* (65,4%), dois micronódulos com VP somática no *KNCJ5* (7,7%), um micronódulo com VP somática no *ATP1A1* (3,8%) e um micronódulo com VP somática no *ATP2B3* (3,8%)⁵⁸.

As formas familiares de HP correspondem a <5% dos casos de HP causado por HB. Dessa forma, a grande maioria dos casos de HP por HB são considerados “aparentemente esporádicos” e não tem etiologia genética definida. Apesar da descrição de VPs somáticas em canais iônicos em micronódulos de HU, nenhum avanço foi feito na elucidação da etiologia genética dessa forma de HP. Dessa forma, a etiologia genética da HB e HU associadas ao HP permanece pouco elucidada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar as bases genéticas do HP causado por hiperplasia adrenal cortical unilateral ou bilateral.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar VPs somáticas nos genes *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* e *CTNNB1* em HU ou HB de indivíduos com HP.
- Sequenciar o exoma (pareado sangue e tecido adrenal) dos casos de HP causado por HU ou HB.
- Validar e realizar o estudo funcional de novas variantes genéticas encontradas no sequenciamento exômico.

3 MÉTODOS

3.1 Considerações Éticas

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) (46928015.1.0000.0068), da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo B). O termo de consentimento livre e esclarecido por escrito foi assinado por todos os pacientes (Anexo C). Este projeto foi financiado pela FAPESP (Processos 2015/17049-8; 2017/13394-8 e 2018/23470-6).

3.2 Avaliações Hormonais e Estudos Moleculares

As avaliações hormonais e os estudos moleculares foram realizados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular - LIM 42, Divisão de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

3.3 Casuística Para os Estudos Moleculares

Atualmente tem-se em seguimento 168 pacientes com diagnóstico confirmado de HP, sendo 119 com aldosteronoma, 13 com HB, 9 com HU, um com carcinoma adrenal cortical produtor de aldosterona, dois com HF tipo I e 24 casos com etiologia indeterminada (lesão unilateral sem dados de seguimento ou lesão bilateral/adrenais normais sem CVS ou com CVS inconclusivo).

O diagnóstico e o rastreamento de HP foram estabelecidos conforme descrito no fluxograma da Figura 1. Após o diagnóstico laboratorial de HP, todos os pacientes realizaram TC de adrenais. O CVA sob estímulo com cortrosina foi realizado conforme protocolo descrito no Anexo A.

Foram selecionados para esse estudo os pacientes com HU ou HB submetidos a tratamento cirúrgico, com tecido armazenado em nitrogênio líquido para que pudesse ser realizado o sequenciamento exômico pareado (sangue e tecido adrenal). A casuística do presente estudo incluiu 11 pacientes submetidos a adrenalectomia unilateral, sendo cinco com HP por HU (uma mulher e quatro homens) e seis com HP por HB (quatro mulheres e dois homens) (Quadros 2 e 3).

Quadro 2 - Caracterização dos 5 casos de hiperaldosteronismo primário por hiperplasia adrenal cortical unilateral

	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5
Sexo	M	M	M	F	M
Idade ao Diagnóstico (anos)	52	50	46	74	52
Hipocalemia	S	S	S	ND	S
A/APR	355,7	379	103,1	119	91
TC de adrenais					
D	Normal	Normal	Espessada	Normal	Nódulo 1,3 cm
E	Normal	Nódulo 1,3 cm	Espessada	Espessada	Normal
Cateterismo de veias adrenais	L	NR	L	NR	CI
Lado da lesão	D	E	D	E	D
Secreção autônoma de cortisol	NR	NR	NR	NR	N
Cura HP	S	S	S	S	S
Cura HA	N	N	N	N	N

M, masculino; F, feminino; S, sim; N, não; ND, não disponível; A/APR, relação aldosterona/atividade plasmática de renina; TC, tomografia computadorizada; D, adrenal direita; E, adrenal esquerda; HP, hiperaldosteronismo primário; HA, hipertensão arterial; NR, não realizou; CI, cateterização inadequada; L, lateralização.

Quadro 3 - Caracterização dos 6 casos de hiperaldosteronismo primário por hiperplasia adrenal cortical bilateral

	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6
Sexo	F	M	F	F	M	F
Idade ao Diagnóstico (anos)	50	58	56	40	65	68
Hipocalemia	S	S	S	S	S	S
A/APR	40	116,50	232,50	30,20	34,25	91,00
TC de adrenais						
D	Normal	Nódulo 1,8 cm	Nódulo 1,4 cm	Normal	Normal	Nódulo 1,2 cm
E	Nódulo 1 cm	Espessada	Espessada	Nódulo 1,2 cm	Nódulo 1,1 cm	Nódulo 2,0 cm
Cateterismo de veias adrenais	NR	I	CI	NR	NR	NR
Secreção autônoma de cortisol	N	N	S	N	NR	NR
Adrenalectomia	E	E	D	E	E	E
Cura HP	N	N	N	N	N	N
Cura HA	N	N	N	N	N	N

M, masculino; F, feminino; S, sim; N, não; A/APR, relação aldosterona/atividade plasmática de renina; TC, tomografia computadorizada; D, adrenal direita; E, adrenal esquerda; HP, hiperaldosteronismo primário; HA, hipertensão arterial; NR, não realizou; CI, cateterização inadequada; I, inconclusivo.

A cura bioquímica do HP foi definida pela correção da hipocalemia, desbloqueio da renina, aldosterona usualmente <10 ng/dL com normalização da relação Aldo/Renina. Em caso de persistência da relação A/R elevada no pós-operatório, realizou-se um teste confirmatório para confirmação da cura bioquímica do HP²¹.

A HU foi definida como produção unilateral de aldosterona, confirmada por CVA ou por cura bioquímica do HP após adrenalectomia unilateral, com anatomopatológico mostrando hiperplasia, sem presença de adenoma, com imunohistoquímica (IHQ) positiva para CYP11B2.

A HB é definida pela presença de excesso de aldosterona bilateral no CVA. Nos casos em que não se realizou CVA, o diagnóstico etiológico de HB foi definido

pela presença de alterações bilaterais na TC, ausência de cura bioquímica do HP após adrenalectomia unilateral e presença de hiperplasia adrenal na análise histopatológica com micronódulos positivos para CYP11B2 na IHQ. Em quatro de seis pacientes, a indicação da adrenalectomia foi guiada pelos achados tomográficos. Somente dois pacientes realizaram CVA: 1) um apresentou cateterização inadequada e a adrenalectomia foi guiada pelo achado da TC; 2) no outro caso, o CVA foi inconclusivo (índice de lateralização= 3,6), mas optou-se por adrenalectomia à D em virtude de uma supressão contralateral à esquerda de 45%.

Atualmente, dispomos de uma equipe especializada em CVA no Serviço do Hospital das Clínicas da FMUSP, o que elevou a taxa de sucesso de cateterização para 80%. Dessa forma, o número de casos com HB confirmada no CVA tem aumentado bastante nos últimos 5 anos.

Os blocos de parafina dos pacientes foram selecionados para revisão do diagnóstico anatomopatológico. Cortes representativos foram feitos a partir dos blocos de parafina e corados com Hematoxilina e Eosina. A revisão das lâminas foi realizada pela patologista Maria Claudia Nogueira Zerbini, do Departamento de Anatomia Patológica da FMUSP.

3.4 Estudos Moleculares

3.4.1 Extração de ácido ribonucleico (RNA)

Os tecidos das lesões adrenais foram obtidos durante procedimento cirúrgico habitual. Após análise macroscópica, o patologista selecionou as áreas representativas da lesão adrenal para coleta do material. Os fragmentos do tecido da suprarrenal foram armazenados em nitrogênio líquido até a realização da extração de DNA e RNA. O DNA e o RNA total das amostras foram extraídos utilizando-se o kit comercial AllPrep DNA/RNA Mini Kit (*Qiagen, Courtaboeuf Cedex, França*). A qualidade do DNA e do RNA extraídos foi avaliada a partir da relação de absorbância $A_{260/280}$ e da integridade das bandas de DNA e RNA ribossômico em gel de agarose 1% após eletroforese. A relação de absorbância $A_{260/280}$ foi maior que 1,8 em todas as amostras. As concentrações das amostras de DNA e RNA total foram determinadas por leitura em espectrofotômetro (*Biophotometer, Eppendorf, Alemanha*). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por transcrição reversa (RT), utilizando-se o produto comercial *Superscript III FirstStrand S* (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*). As amostras foram armazenadas a - 20 °C.

Amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico. O DNA foi extraído de acordo com procedimento padronizado no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Faculdade de Medicina da USP, São Paulo (Anexo D). A concentração do DNA extraído foi obtida por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm (1 unidade DO 260 = 50 µg/mL). A relação ideal entre as leituras em 260 e 280 nm para a caracterização da pureza do material é entre 1,80 e 2,00. As amostras foram mantidas congeladas a -20 °C até seu uso.

3.4.2 Sequenciamento Automático pelo método de Sanger

As regiões *hot-spot* dos genes *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* e *CTNNB1* foram sequenciadas em cDNA em todos os casos selecionados para este estudo. Além do HF tipo III (variante patogênica germinativa no *KCNJ5*), o HF tipo I (hiperaldosteronismo supressível por glicocorticoide) foi excluído em todos os pacientes neste estudo.

Em cada reação de PCR para os genes *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* e *CTNNB1*, foram amplificados 100 ng a 200 ng de material genético (cDNA do tecido adrenal para investigação de variantes somáticas nos genes *KCNJ5*, *ATP1A1* e *ATP2B3*; DNA genômico do tecido adrenal para pesquisa de variantes somáticas no gene *CTNNB1* e DNA genômico de leucócitos periféricos para investigação de variantes germinativas no *KCNJ5*). Todas as reações de PCR foram realizadas utilizando 10 pmol/μL a 15 pmol/μL de cada oligonucleotídeo específico (Quadro 4) e 200 μM de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) para um volume final de 25 μL.

A região *hot-spot* do gene *KCNJ5* foi sequenciada utilizando 1 U de Platinum Taq DNA Polimerase High Fidelity (*Invitrogen*), além do tampão (600 mM Tris-SO₄, 180 mM (NH₄)₂SO₄,) e 50 mM de MgSO₄. A temperatura de anelamento utilizada foi de 56°C.

Quadro 4 - Oligonucleotídeos utilizados para sequenciar as regiões *hot-spot* dos genes *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* a partir de cDNA; e dos genes *KCNJ5* e *CTNNB1* a partir de DNA genômico

Nome	Sequência
KCNJ5_F	GGTGACCTGGACCATGTTGGCG
KCNJ5_R	CTTGGCAGGTCATGCCTGTGGC
DNA_KCNJ5_F	GTGGCCTTCCATCTTGTGTT
DNA_KCNJ5_R	AGGCACAGACCTGCATCTTC
ATP1A1_exon4_F	TGCTCGTGCAGCTGAGATCC
ATP1A1_exon4_R	TTCTGTAGCAGCTTGGATGC
ATP1A1_exon8_F	CGCACGTGGTATTGTTGTCT
ATP1A1_exon8_R	CACTGTCATCCGGTTCTGAG
ATP2B3_F	CGCACCAGGTTGTTGTCTTT
ATP2B3_R	CGTCATCATCCTGGTCCTCT
CTNNB1_F	TGGGTCATATCACAGATTCTTTTTTT
CTNNB1_R	TCAAAACTGCATTCTGACTTTCA

F, *forward*; R, *reverse*.

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

A concentração de cDNA ou DNA dos produtos gerados pela PCR foi estimada através da comparação com fragmentos do marcador de peso molecular de concentração conhecida (Φ X) em gel de agarose. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à purificação enzimática com a combinação das enzimas fosfatase alcalina de camarão (2 U/ μ L) e exonuclease I (10 U/ μ L) (*PCR product pre-sequencing kit, Amersham Life Science, Cleveland, OH, EUA*), com incubação a 37°C por 15 minutos, seguido de 80°C por mais 15 minutos para inativação das enzimas. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit

ABI PrismTMBigDyeTerminator (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) e quantidades variáveis de produto de PCR (10 a 100 ng) de acordo com o tamanho do fragmento. Os produtos desta reação foram submetidos à eletroforese em sequenciador automático (*ABI PrismGeneticAnalyzer 3100 automatic DNA sequencer*). A leitura dos eletroferogramas foi realizada através do programa *Sequencher 4.10.1* (GeneCodes Corporation, Ann Arbor, EUA).

3.4.3 Sequenciamento paralelo em larga escala

O sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE) e a análise de bioinformática foram realizados no Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (SELA), Rede PREMiUM da FMUSP, financiado pela FAPESP com Equipamentos Multiusuários (14/50137-5). A genotipagem do exoma foi realizada nos onze pacientes (cinco hiperplasias corticais unilaterais e seis hiperplasias corticais bilaterais), de forma pareada em DNA de sangue periférico e DNA de tecido adrenal. O SPLE foi realizado em sequenciadores da plataforma Illumina (*Illumina, Inc, San Diego, CA, EUA*) e envolveu três etapas fundamentais:

a) Confecção de bibliotecas de fragmentos de DNA. A biblioteca para o sequenciamento do exoma dos indivíduos selecionados foi preparada com kits comerciais *SureSelectXT Human All Exon V5+UTRs* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Inicialmente, o DNA genômico foi fragmentado por ação mecânica, sendo adicionados os adaptadores (que são sequências complementares às sequências de oligonucleotídeos presentes na *flow-cell*) e os *barcodes* (identificadores específicos para o DNA de cada paciente). A seguir, as bibliotecas foram enriquecidas através da adição de sondas biotiniladas (sequências selecionadas dos genes de todo o exoma). Após uma

hibridação do DNA fragmentado com essas sondas, foi feita a captura das regiões de interesse através de *beads* magnéticos acoplados à estreptavidina. Os fragmentos capturados pela biotina-estreptavidina foram purificados e amplificados estando prontos para o sequenciamento paralelo em larga escala.

b) Amplificação clonal. Nesta etapa, as bibliotecas com seus fragmentos de DNA ligados aos adaptadores, foram depositados em uma lâmina especial, denominada *flowcell*, em cuja superfície estão fixados, de maneira paralela, duas espécies de oligonucleotídeos. Após a ligação dos adaptadores aos seus oligonucleotídeos complementares presentes na superfície da *flowcell*, aconteceu a clusterização, onde cada molécula foi amplificada várias vezes através de uma reação conhecida como PCR em ponte (*bridge PCR*). Ao final desta etapa, foram gerados *clusters* de moléculas de DNA idênticas à molécula original, ligadas covalentemente à superfície da *flowcell*.

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

100 pares de bases, podendo ser lidas tanto em configuração *single-end* (quando apenas a sequência *sense* da molécula do DNA é lida), quanto *paired-end* (quando a sequência *antisense* da molécula do DNA também é lida), permitindo leituras de fragmentos de até 200 pares de base. Ao fim deste processo, as sequências lidas foram separadas entre si de acordo com seus *barcodes*, sendo então pareadas as sequências *sense* e *antisense*, criando sequências contíguas. Estas foram alinhadas para comparação com a sequência de DNA referência, de forma a permitir a comparação entre o sequenciamento obtido e a sequência referência.

3.4.4 Análise de bioinformática

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

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

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

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

- d) Marcação de sequências duplicadas. Cópias idênticas de determinadas sequências de uma biblioteca, também chamadas de duplicatas, são artefatos inerentes ao SPLE e podem gerar erros em etapas posteriores do processamento. Além disso, um número excessivo de sequências duplicadas pode indicar problemas na construção da biblioteca. Estas duplicatas devem ser marcadas para posteriormente serem quantificadas e desconsideradas nas próximas análises. Para a marcação das sequências duplicadas foi utilizada a ferramenta *bammarkduplicates* do software *biobambam2*. Após esta etapa, os arquivos BAM ficaram prontos para os diversos tipos de análise descritos posteriormente.
- e) Controle de qualidade dos arquivos BAM. Após a marcação das sequências duplicadas foi feita uma análise quantitativa de alguns parâmetros para indicar a qualidade e a quantidade de sequências obtidas de determinada biblioteca. Além da qualidade global das sequências e da taxa de erro, foram calculados a quantidade de sequências duplicadas, o número de sequências não mapeadas e a cobertura média das regiões alvo do genoma. Esta verificação foi feita pelo software *Qualimap2*.
- f) Pesquisa de alterações germinativas. Nesta etapa foram determinados, com bases estatísticas, todos os alelos divergentes do genoma referência, que foram reportados em arquivos de texto no formato *Variant Call Format* (VCF). Além das coordenadas genômicas e da alteração observada, estes arquivos também contém informações cruciais tais como a frequência do alelo alterado em relação ao normal para cada posição, escores de qualidade, nível de cobertura, e a frequência daquele alelo em relação à

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

- g) Pesquisa de alterações somáticas. A pesquisa de alterações somáticas consiste na comparação pareada entre amostras oriundas da linhagem germinativa e tecidual do mesmo indivíduo. De forma simplificada, é feita uma busca de alterações que estejam presentes apenas no tecido (e

não na linhagem germinativa). Alterações de ponto ou pequenas inserções e deleções são identificadas através de softwares especificamente desenvolvidos para pesquisar eventos somáticos. Tipicamente, estes softwares processam em paralelo a amostra germinativa e somática e utilizam modelos estatísticos bastante sofisticados que levam em consideração eventuais alterações do número de cópia em determinada região, contaminação do tecido tumoral por células da linhagem germinativa e heterogeneidade na população de células tumorais (subclones). Para este projeto, foram utilizados três softwares: o *Varscan2*, o *Mutect2* e o *Lancet*. Cada um se baseia em modelos estatísticos diferentes, aumentando as chances de encontrarmos alterações novas. Estes softwares geram arquivos VCF semelhantes aos gerados pelo *Freebayes*, mas indicando as alterações somáticas. O processo de anotação e identificação de variantes é semelhante ao descrito anteriormente. Além de pequenas inserções ou deleções, também foi realizada a pesquisa de eventos cromossômicos ou subcromossômicos, como variação do número de cópias (CNV) ou perda de heterozigose (LOH). Para estas análises, utilizou-se o software AdTex.

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

O processo de filtragem das variantes germinativas e somáticas dos pacientes com HU ou HB está ilustrado nas Figuras 5 e 6. Como as HU e HB são alterações benignas, o número de variantes somáticas selecionadas após o filtro 3 foi em média de 7 por paciente. Grandes deleções ou amplificações não foram identificadas em nenhum dos casos.

Figura 5 - Processo de filtragem das variantes germinativas identificadas no *Freebayes* que foram anotadas utilizando o *Annovar*

Figura 6 - Processo de filtragem das variantes somáticas identificadas no *Lancet* que foram anotadas utilizando o *Annovar*

3.4.5 Seleção das variantes de interesse

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

expressos no córtex adrenal normal de acordo com um banco de tecidos normais de autópsia, denominado *Genotype-Tissue Expression* (GTEx) (<https://www.gtexportal.org/>). Adicionalmente, foram selecionadas variantes nos genes já previamente relacionados ao HP ou associados à hiperplasia adrenal. Para confirmar a presença das variantes, foram visualizados todos os *reads* gerados no sequenciamento, alinhados ao genoma referência, no programa *Integrative Genomics Viewer* (IGV) do *Broad Institute* (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>).

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

A classificação das variantes germinativas em relação ao fenótipo do paciente foi realizada seguindo a recomendação da *American of Medical Genetics and Genomics e Association for Molecular Pathology* (ACMG-AMP)⁵⁹. Para determinação de patogenicidade, esta classificação leva em consideração a frequência na população, análise *in silico*, dados de segregação, dados de análises funcionais, dentre outros. A variante é classificada em patogênica (P), provavelmente patogênica (LP), variante de significado incerto (VUS), provavelmente benigna (LB) ou benigna (B). Foi utilizado o auxílio de um programa denominado InterVar (<http://wintervar.wglab.org/>) para classificar as variantes.

3.3.6 Avaliação das métricas do exoma

A cobertura vertical média foi de 104x. Mais de 90% das sequências alvo foram cobertas pelo menos 20x (Figura 7).

Figura 7 - Cobertura vertical das corridas de exoma. Mais de 90% das sequências alvo tiveram cobertura vertical de no mínimo 20x

3.5 Imunohistoquímica

Os procedimentos de IHQ foram realizados no Laboratório de Investigação em Patologia Hepática LIM 14 da FMUSP. Os anticorpos utilizados foram anti-CYP11B2 (anticorpo de rato monoclonal, clone 41-17B, *Merck MABS125*, Temecula, CA, EUA), anti-PDE1A (anticorpo de rato monoclonal, clone 2-C3, *Santa Cruz Biotechnology*, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), anti-PDE2A (anticorpo de rato monoclonal, clone 7-E3, *Santa Cruz Biotechnology*) e anti-PDE3B (anticorpo de rato monoclonal, clone *Santa Cruz Biotechnology*).

Para a realização do procedimento de imunohistoquímica foram seguidas as seguintes etapas enumeradas e descritas abaixo:

- a) Desparafinização dos cortes de 3µm de espessura do material incluído em parafina; incubação com xilol a 60°C.

- b) Hidratação dos cortes em concentrações de Etanol a 100%.
- c) Recuperação antigênica mediante incubação das lâminas em solução de ácido cítrico 10mM pH 6,0 (*Merck, Darmstadt, Alemanha*) em panela a vapor.
- d) Bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) a 6% diluída v/v em metanol, em três banhos de 10 minutos cada.
- e) Bloqueio de proteínas inespecíficas com Cas Block™ (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*) por 10 minutos a 37°C; incubação com o anticorpo primário
- f) Incubação das lâminas com anticorpo primário (específico para o antígeno) diluído em solução de albumina bovina (BSA) (*Sigma, St Luis, MO, EUA*) 1,0% e azida sódica NaN₃ (*Inlab, São Paulo, Brasil*) 0,1% em PBS.
- g) Incubação com o bloqueador pós-primário (*Post Primary Block, NovoLink Max Polymer Detection System, Vision Biosystems™, Reino Unido*).
- h) Incubação com NovoLink (Polímero) do mesmo kit por 30 minutos a 37°C.
- i) Revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (*Sigma, St Luis, MO, EUA*) a 0,06%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfóxido (*Labsynth, São Paulo, Brasil*) a 1% em PBS.
- j) Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por um minuto, lavagens em água corrente e água destilada.
- k) Desidratação dos cortes em banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol absoluto, diafanização em três banhos de xilol e montagem em meio permanente (*Merck, Darmstadt, Alemanha*) com lamínula.

A quantificação da expressão imunohistoquímica foi realizada pela patologista Maria Claudia Nogueira Zerbini do Departamento de Anatomia Patológica da FMUSP por meio de método semiquantitativo de avaliação visual. A expressão foi classificada de acordo com o percentual de células da glomerulosa que apresentaram expressão positiva para cada um dos anticorpos estudados (Quadro 5). Marcações com +++ ou ++++ foram consideradas fortes.

Quadro 5 - Escala semiquantitativa para a expressão proteica por imunohistoquímica

Quantificação	Significado
0	Expressão negativa
+	< 25% das células com expressão positiva
++	de 25 a 50% das células com expressão positiva
+++	de 50 a 75% das células com expressão positiva
++++	>75% das células com expressão positiva

3.6 Estudos Funcionais

Os estudos funcionais das variantes encontradas nos genes das fosfodiesterases foram realizados, em parte, no Laboratório do Dr. Stratakis no NIH.

3.6.1 Avaliação da atividade da proteína quinase A (PKA) em tecido adrenal congelado

Foi realizada a avaliação da atividade da PKA nos casos que ainda tinham tecido adrenal congelado armazenado em nitrogênio líquido. No total foram sete casos avaliados, sendo dois aldosteronomas, uma HU (caso 1 do Quadro 2) e duas HBs (casos 3 e 4 do Quadro 3), além de um controle positivo e um tecido adrenal normal. A via da PKA, mediada por AMPc, é uma das vias de sinalização

intracelular envolvidas na produção de aldosterona^{60,61}. Para esta avaliação, foi utilizado um ensaio não radioativo (*PepTag Assay for non-radioactive detection c-AMP-Dependent Protein Kinase*, Promega, Wisconsin, EUA) para detecção de atividade da PKA dependente de AMPc em tecido congelado, seguindo o protocolo do fabricante.

3.6.2 Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real

Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real foi realizada em tecido congelado de quatro aldosteronomas e cinco HBs. O cDNA foi sintetizado por RT utilizando-se o kit comercial Superscript III First Strand S (*Invitrogen*). A quantificação do cDNA foi realizada no aparelho ABI Prism 7000 (*AppliedBiosystems, Forster City, CA, EUA*) utilizando-se ensaios 5' nuclease do sistema Taqman (*AppliedBiosystems*). As condições de PCR foram: 2 min a 95 °C, 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 30 segundos, e uma etapa final a 72 °C por 30 segundos. Os ensaios *Taqman* para os genes alvos foram: *SGK1* (Hs00178612_m1), β -actina (*ACTB*, 4310881E) e β -glucoronidase (*GUSB*, 4310888E). A quantificação relativa foi realizada através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ ⁶². Um pool comercial de adrenais normais obtidas de autópsias foi usado como amostra referência (*Clontech, Palo Alto, CA, EUA*).

3.6.3 Avaliação funcional das variantes em genes da família das fosfodiesterases

3.6.3.1 Mutagênese

A região codificadora do gene *PDE2A* wild type (WT) (NM_002599.5) foi clonada no vetor pCMV6-AC-GFP adquirido da Origene (RG207219, *Origene*, Rockville, MA, USA). A variante p.Ile629Val foi introduzida no modelo humano *PDE2A* WT usando o kit *QuikChange Lightning Site-directed Mutagenesis Kit* (210518-5, *Agilent Technologies*), seguindo o protocolo do fabricante. Os *primers* mutagênicos utilizados estão listados no Quadro 6. A região codificadora do gene *PDE3B* WT (NM_000922.4) foi clonada no vetor pCMV6-Entry (PS100001) adquirido da Origene (SC120214, *Origene*). As variantes p.Arg217Gln e p.Gly392Val foram introduzidas nos modelos humanos *PDE3B* WT usando o kit *QuikChange Lightning Site-directed Mutagenesis* (210518-5, *Agilent Technologies*), seguindo o protocolo do fabricante. Os *primers* mutagênicos usados estão listados no Quadro 6.

Quadro 6 - Oligonucleotídeos utilizados na mutagênese dos genes *PDE2A* e *PDE3B*

Nome	Sequência
PDE2A_I629V_MUT_F	CAGTCAATTTTGTAGTTGTTGACGAAATTCATGTCCTGCAGCATG
PDE2A_I629V_MUT_R	CATGCTGCAGGACATGAATTCGTCAACAACACTACAAAATTGACTG
PDE3B_R217Q_MUT_F	AGAACGCAGTGCTGGAGCCGCAGCG
PDE3B_R217Q_MUT_R	CGCTGCGGCTCCAGCACTGCGTTCT
PDE3B_G392V_MUT_F	TCTTTGGCCTACAGGAAACTGAGAAAGCACCCATT
PDE3B_G392V_MUT_R	AATGGGTGCTTTCTCAGTTTCCTGTAGGCCAAAGA

3.6.3.2 Cultura celular

Células epiteliais humanas da linhagem HEK 293T (*Human Embryonic Kidney 293T cells*) foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, high glucose, pyruvate, no glutamine; 10313, *Gibco, Waltham, MA, USA*), suplementado com soro fetal bovino a 10% (100-106, *Gemini Bio Products, West Sacramento, CA, USA*) e antibiótico a 1% (Penicilina-Streptomicina – 15140-148, *Gibco*) em uma atmosfera umidificada, a 37°C com 5% CO₂.

3.6.3.3 Transfecção

Células da linhagem HEK 293T foram semeadas em placas de seis poços na densidade de 3×10^5 células por poço. Após 24 horas de incubação, as células foram transfectadas com Lipofectamina 2000 (11668030, *Invitrogen*), de acordo com o protocolo do fabricante, usando meio de soro reduzido Opti-MEM (31985-070, *Gibco*) e 500 ng de cada vetor (*PDE2A* humano WT, p.Ile629Val *PDE2A*; *PDE3B* humano WT, p.Arg217Gln *PDE3B* e p.Gly392Val *PDE3B*), separadamente. O vetor vazio pCMV6-Entry foi usado como controle negativo.

Paralelamente, foi realizado o mesmo procedimento descrito acima para obtenção de material para estudo da atividade da via da PKA. A única diferença foi que as células foram semeadas em placas de 12 poços, na densidade de $1,5 \times 10^5$ células por poço. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, de forma independente, com resultados concordantes.

3.6.3.4 Análise da expressão proteica por Western blot

Após 24 horas da transfecção, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 50 µL de tampão de lise gelado (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, SDS 0,1%, Nonidet P-40 1%) contendo um coquetel de inibidores de protease e de fosfatase (PPC1010, *Sigma*). As células coletadas foram incubadas por 30 minutos em gelo e, em seguida, centrifugadas por 15 minutos a 4 °C, 13000 rpm. O sobrenadante foi coletado e as proteínas foram dosadas utilizando-se o kit Pierce™ BCA Protein Assay (23227, *Thermo Scientific, Waltham, MA, USA*), seguindo o protocolo do fabricante.

Após quantificação dos extratos proteicos, 50 µg de proteínas totais de cada amostra foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose ou PVDF (*BioRad, Hercules, CA, USA*) e foi realizado Western blot utilizando anticorpos contra DDK (TA 50011-100, *Origene*), na diluição 1:1000; GFP (TA 15004, *Origene*), na diluição 1:1000 e GAPDH (SC-32233, *Santa Cruz Biotechnology*), na diluição 1:2000. Para a revelação das bandas, utilizou-se anticorpos secundários fluorescentes (925-32211 IRDye 800CW Cabra anti-coelho; 827-08364 IRDye 800CW Cabra anti-camundongo e 926-68073 IRDye 680RD Asno anti-coelho; *Li-Cor, Lincoln, NE, USA*), na diluição 1:20000.

Além do Western blot com anticorpos secundários fluorescentes, foi realizado Western blot para SGK1 e SCNN1G sem fluorescência: 15µg de proteína foram carregadas por poço em um gel Bolt 4-12% Bis-Tris Plus (*Invitrogen*) e posteriormente transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas em leite 5%, lavadas vigorosamente com TBS 1x com Tween-20

0.1% e então incubadas com o anticorpo primário diluído em BSA 2% em TBS 1X com Tween-20 0.1% durante a noite, a 4 °C com agitação. Os anticorpos primários usados foram: anti-SGK1 (sc-28338, *Santa Cruz Biotechnology*; camundongo, 1:500), SCNN1G (13943-1-AP, *Proteintech*; coelho, 1:1000) e GAPDH (sc-25778, *Santa Cruz Biotechnology*; coelho, 1:1000) como controle. As membranas foram então incubadas com anticorpos secundários (macaco anti-coelho ou asno anti-camundongo) por 1h em temperatura ambiente antes de visualizar as membranas com substrato quimioluminescente SuperSignal West Pico (*Thermo Scientific*).

O programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/y/>) foi utilizado para a quantificação densitométrica das bandas. A partir dos valores das áreas de cada banda, foi calculada a razão entre a expressão de cada proteína analisada e de GAPDH (*Santa Cruz Biotechnology*). Gerou-se então um gráfico que mostra os níveis de expressão diferencial de cada proteína analisada. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.6.3.5 Avaliação da atividade da via da PKA

Após 24 horas da transfecção, as células foram lavadas com 50µL de PBS e um coquetel de inibidores de protease e de fosfatase (PPC1010, *Sigma*). As células coletadas foram centrifugadas por 8 minutos a 4 °C, 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet guardado a -80°C por 24 horas.

Após 24 horas, o pellet foi ressuspensionado com 50 µl de tampão de lise PKA gelado (10mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 2 mM PMSF e coquetel de inibidores de protease I (*EMD Millipore, Billerica, MA, USA*), usando seringa de insulina. O lisado foi centrifugado por 20 minutos a 4 °C, 13000 rpm. O

sobrenadante foi coletado e as proteínas foram dosadas utilizando-se o kit Micro BCATM Protein Assay (23235, *Thermo Scientific*), seguindo o protocolo do fabricante. A atividade enzimática da PKA foi mensurada utilizando-se um ensaio radioativo com ATP marcado com P32, conforme descrito previamente⁶³.

3.7 Análise Estatística

A análise de bioinformática foi realizada utilizando o programa IBM SPSS Software (25.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) e GraphPad Prism (version 8.4.2; San Diego, CA, EUA). Dados contínuos foram expressos por valores de mediana (do mínimo ao máximo). Dados com distribuição normal (atividade da PKA e quantificação densitométrica) foram expressos como média $\pm$ DP e avaliados por teste t pareado. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Investigação de Variantes Somáticas em Hiperplasias Adrenais Corticais Unilaterais e Bilaterais

As regiões *hot spot* dos genes *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* e *CTNNB1* foram sequenciados pelo método de Sanger em cinco casos de HU e seis casos de HB. O *CACNA1D* foi analisado por SPLE nos onze casos. Variantes patogênicas somáticas no *KCNJ5* previamente descritas (p.Gly151Arg e p.Leu168Arg) foram identificadas em 2 HBs, porém o sequenciamento do *KCNJ5* em DNA germinativo foi normal nesses casos (Figura 8). HF tipo I foi excluído em todos os casos após pesquisa do gene quimérico *CYP11B1/CYP11B* por PCR de cadeia longa. Além das duas VPs no *KCNJ5*, o sequenciamento exômico das hiperplasias não identificou variantes somáticas em genes que apresentassem expressão em tecido adrenal, relação com a síntese de aldosterona ou proliferação celular.

Figura 8 - Eletroferogramas obtidos por meio do sequenciamento pelo método Sanger de duas hiperplasias adrenais corticais bilaterais, mostrando as variantes patogênicas somáticas p.Gly151Arg (A) e p.Leu168Arg (B) no gene *KCNJ5*

4.2 Achados da Análise do Exoma

Após a filtragem (Figuras 5 e 6), foi realizada uma busca ativa por variantes em genes codificadores de canais iônicos ou previamente relacionados com tumor ou hiperplasia do córtex adrenal. Foram selecionadas variantes germinativas raras (frequência alélica mínima [MAF] $\leq 0,01\%$ no gnomAD), localizadas em resíduos conservados entre as espécies, em genes expressos no córtex adrenal normal, segundo dados GTEx, e consideradas deletérias pela análise *in silico* (≥ 3 ferramentas de predição de patogenicidade *in silico*, Anexo E). Algumas variantes em genes previamente associados ao fenótipo de HP ou hiperplasia adrenal foram incluídas, mesmo não preenchendo todos os critérios descritos acima (como MAF $< 0,01\%$ ou análise *in silico* indicando patogenicidade).

Quadro 7 - Análise das variantes germinativas selecionadas a partir do sequenciamento exômico

Gene	Variante	Tipo	MAF (%) gnomAD	MAF (%) ABraOM	Domínio proteico	AA conservado	Deletéria em ≥ 3 algoritmos	Classificação ACMG
Hiperplasia Unilateral								
<i>CACNA1H</i> (Caso 1) [#]	c.5428-3C>T	<i>splicing</i>	0	0	NA	NA	Não	VUS
<i>CACNA1I</i> (Caso 2) [#]	p.Leu2095Ile	<i>missense</i>	0,05*	0	Não	Sim	Sim	VUS
<i>PDE1A</i> (Caso 4) [#]	p.Ala59Val	<i>missense</i>	0,0004	0	Não	Sim	Sim	VUS
Hiperplasia Bilateral								
<i>GNAS</i> (Caso 1) ^{&}	p.Arg14Leu	<i>missense</i>	0	0,08	Não	Não	Sim	VUS
<i>PDE3B</i> (Caso 2) ^{&}	p.Arg217Gln	<i>missense</i>	0,0006	0	Não	Sim	Não	VUS
<i>PDE3B</i> (Caso 3) ^{&}	p.Gly392Val	<i>missense</i>	0,001	0,08	Não	Sim	Sim	VUS
<i>PDE2A</i> (Caso 4) ^{&}	p.Ile629Val	<i>missense</i>	0	0	Não	Sim	Sim	VUS

*0,1% em africanos (15 alelos); [#]referente aos casos do Quadro 2; [&]referentes aos casos do Quadro 3; MAF, frequência alélica mínima; AA, aminoácido; NA, não se aplica; ACMG, *American of Medical Genetics and Genomics*; VUS, variante de significado incerto.

Todas as variantes selecionadas na análise do exoma foram confirmadas por Sanger, com posterior realização de segregação familiar (Quadro 7). Todas as variantes germinativas selecionadas foram encontradas em heterozigose e classificadas como variantes de significado incerto (VUS), segundo os critérios da ACMG-AMP. Variantes em genes da família das fosfodiesterases (PDEs) foram identificadas em quatro pacientes (uma com HU e três com HB).

4.2.1 Análise das variantes germinativas em genes relacionados à via da PKA

4.2.1.1 Variantes germinativas em genes da família das fosfodiesterases

A) Gene *PDE1A*: c.176C>T; p.Ala59Val

O gene *PDE1A* está localizado no cromossomo 2q32.1. Enzimas da família da PDE1, como a PDE1A, são PDEs dependentes de cálcio/calmodulina (CaM-PDEs), ou seja, são ativadas pela calmodulina na presença de cálcio. A PDE1A apresenta ação dual, agindo na degradação tanto de AMPc quanto GMPc, porém com afinidade maior pelo GMPc⁶¹. Este gene está expresso em glândulas adrenais normais segundo dados do GTEx.

A variante germinativa em heterozigose p.Ala59Val no exon 2 da *PDE1A* é rara (MAF de 0,0004% no GenomAD), altera um aminoácido altamente conservado entre as espécies e é predita de ser deletéria em mais de três algoritmos de predição *in silico* (Quadro 7). Esta variante foi encontrada em uma paciente com diagnóstico de HP aos 74 anos (Caso 4 do Quadro 2) e antecedente de HA desde os 69 anos (Figura 9). A paciente não apresentava hipocalemia ao diagnóstico e tinha relação A/APR 119. A TC evidenciou espessamento à esquerda e adrenal direita normal. A paciente foi submetida a adrenalectomia esquerda e a análise anatomopatológica revelou hiperplasia difusa com

micronódulos positivos para CYP11B2 na IHQ. Durante a evolução, houve cura bioquímica do HP e melhora do controle pressórico, confirmando o diagnóstico de HP por HU. A paciente está em seguimento há 8 anos e meio, sem recorrência do HP. Não foi possível prosseguir com a segregação familiar.

Figura 9 - Eletroferograma da variante p.Ala59Val da *PDE1A* obtido através do sequenciamento pelo método Sanger

B) Gene *PDE2A*: c.1885A>G; p.Ile629Val

O gene *PDE2A* está localizado no cromossomo 11q13.4. Enzimas da família da PDE2 hidrolisam tanto adenosina monofosfato cíclico (AMPc) como guanosina monofosfato cíclico (GMPc), com maior afinidade pelo GMPc. Na presença de GMPc, a hidrólise do AMPc pela PDE2 é significativamente aumentada⁶¹. Este gene está expresso em glândulas adrenais normais, segundo dados do GTEx, e a *PDE2A* está envolvida na regulação da produção de aldosterona pela zona glomerulosa⁶⁰.

A variante germinativa em heterozigose p.Ile629Val no exon 22 da *PDE2A* nunca foi descrita, altera um aminoácido altamente conservado entre as espécies e é deletéria em mais de três algoritmos de predição *in silico* (Quadro 7). Esta variante

foi encontrada em uma paciente com diagnóstico de HP aos 40 anos (Caso 4 do Quadro 3) e antecedente de HA desde os 13 anos (Figura 10). A paciente apresentava hipocalcemia ao diagnóstico, aldosterona 12,7 ng/dL, APR 0,42 ng/mL/h e A/APR 30,2. Na TC apresentava nódulo de 1,2 cm à esquerda com adrenal direita normal. A paciente foi submetida a adrenalectomia esquerda, porém sem cura bioquímica do HP. A análise anatomopatológica da adrenal ressecada revelou hiperplasia micronodular com micronódulos positivos para CYP11B2 na IHQ, comprovando tratar-se de produção bilateral. Devido às alterações anatomopatológicas e ausência de cura bioquímica do HP, confirmou-se o diagnóstico de HB.

A variante foi encontrada na mãe da paciente (75 anos), com HA de longa data (não soube precisar o ano do diagnóstico). O rastreio para HP foi negativo (aldosterona 15,4 ng/dL e renina 30 uUI/mL) em vigência de uso de hidralazina e verapamil. As três irmãs da paciente (50, 53 e 54 anos) tem HA, mas sem a variante p.Ile629Val na *PDE2A* (Figura 10). Todas apresentaram rastreio negativo para HP.

Figura 10 - Segregação familiar e eletroferograma da variante p.Ile629Val da *PDE2A*. A, Heredograma mostrando segregação familiar da variante p.Ile629Val da *PDE2A*. Preenchimento preto, indivíduo portador de HP; Preenchimento cinza, indivíduos portadores de HA; Seta, caso índice. B, Eletroferograma da variante obtido pelo método Sanger. WT, *wild type*

C) Gene *PDE3B*: c.650G>A; p.Arg217Gln

O gene *PDE3B* está localizado no cromossomo 11q15.1. Enzimas desta família também hidrolisam AMPc e GMPc. Apesar de apresentarem uma taxa de hidrólise 10 vezes maior para o AMPc, a afinidade pelo GMPc é significativamente maior⁶⁴. Apesar da sua expressão estar ausente em adrenais pelo GTEx, houve dois casos não relacionados de HP por HB com variantes no gene da *PDE3B*.

A variante germinativa em heterozigose p.Arg217Gln no exon 1 da *PDE3B* é rara (MAF de 0,0006% no GenomAD), altera um aminoácido altamente conservado entre as espécies e é deletéria em três algoritmos de predição *in silico* (Quadro 7). Esta variante foi encontrada em um paciente com diagnóstico de HP aos 58 anos (Caso 2 do Quadro 3) e antecedente de HA desde os 18 anos (Figura 11). O paciente apresentava hipocalcemia ao diagnóstico, aldosterona 23,3 ng/dL, APR 0,2 ng/mL/h e A/APR 116,5. A TC revelou nódulo de 1,8 cm à direita e espessamento à esquerda. O paciente foi submetido a CVA com índice de lateralização de 3,6 (entre 3 e 4 é inconclusivo). Como havia supressão contralateral à E de 45%, optou-se por adrenalectomia unilateral E. No entanto, o paciente não apresentou cura bioquímica do HP. A análise anatomopatológica da adrenal ressecada revelou hiperplasia micronodular com micronódulos positivos para CYP11B2 na IHQ, comprovando tratar-se de produção bilateral. Não foi possível contactar os familiares para segregação familiar.

Figura 11 - Eletroferograma da variante p.Arg217Gln da *PDE3B* obtido através de sequenciamento pelo método Sanger

D) Gene *PDE3B*: c.1175G>T; p.Gly392Val

A variante germinativa em heterozigose p.Gly392Val no exon 3 da *PDE3B* é rara (MAF de 0,001% no GenomAD), altera aminoácido altamente conservado entre as espécies e é deletéria em mais de três algoritmos de predição *in silico* (Quadro 7). Esta variante foi encontrada em uma paciente com diagnóstico de HP aos 56 anos (Caso 3 do Quadro 3) e antecedente de HA desde os 33 anos (Figura 12). A paciente apresentava hipocalemia ao diagnóstico, aldosterona 45,6 ng/dL, APR 0,2 ng/mL/h e A/APR 232,5. A TC revelou nódulo de 1,4 cm à direita e espessamento a esquerda. A paciente foi submetida a CVS, porém a cateterização não foi adequada. A paciente foi submetida a adrenalectomia direita guiada pela TC, porém não apresentou cura bioquímica do HP. A análise anatomopatológica da adrenal ressecada revelou hiperplasia micronodular com macronódulo (1,7 cm) e IHQ positiva para CYP11B2 (macronódulo e micronódulos). Devido às alterações anatomopatológicas e ausência de cura bioquímica do HP, confirmou-se o diagnóstico de HB.

O filho da paciente de 30 anos, sem comorbidades ou uso de medicações e com rastreio negativo para HP (aldosterona 7,7 ng/dL e renina 23,8 uUI/mL) não é carreador

da variante (Figura 12). O rastreamento da variante em dois irmãos da paciente (homem de 60 anos e mulher de 61 anos), ambos com diagnóstico de HA após 40 anos e rastreio negativo para HP, foi negativo. A paciente tem mais três irmãos com HA (dois homens e uma mulher) que não puderam comparecer para avaliação.

Figura 12 - Segregação familiar e eletroferograma da variante p.Gly392Val da *PDE3B*. A, Heredograma mostrando segregação familiar da variante p.Gly392Val da *PDE3B*. Preenchimento preto, indivíduo portador de HP; Preenchimento cinza, indivíduos portadores de HA; Seta, caso índice. B, Validação da variante p.Gly392Val da *PDE3B* por sequenciamento pelo método de Sanger. WT, *wild type*

4.2.1.2 Variante germinativa no gene codificador da subunidade α da proteína G

A) Gene *GNAS*: c.41G>T; p.Arg14Leu

O gene *GNAS* (subunidade α da proteína G estimulatória de adenilatociclase) está localizado no cromossomo 20q13.32 e codifica a subunidade α estimuladora da proteína G. O *GNAS* apresenta elevada expressão em glândulas adrenais normais, segundo dados do GTEx, e já foi associado com hiperplasia primária macronodular bilateral das adrenais⁶⁵. A VP somática p.R201C da *GNAS* já foi identificada em raros casos de aldosteronomas⁶⁶.

A variante germinativa em heterozigose p.Arg14Leu localizada no exon 1 do *GNAS* é rara, localizada em região de domínio proteico e é deletéria em mais de três

algoritmos de predição *in silico* (Quadro 7). Essa variante foi identificada em uma paciente com diagnóstico de HP aos 50 anos (Caso 1 do Quadro 3) e antecedente de HA desde os 43 anos (Figura 13). A paciente apresentava hipocalcemia ao diagnóstico, aldosterona 20 ng/dL, APR 0,5 ng/mL/h e A/APR 40. A TC revelou nódulo de 1 cm à esquerda e adrenal direita normal. A paciente foi submetida a adrenalectomia esquerda, porém sem cura bioquímica do HP. A análise anatomopatológica da adrenal ressecada revelou hiperplasia difusa com micronódulos positivos para CYP11B2 na IHQ. Devido às alterações anatomopatológicas e ausência de cura bioquímica do HP, confirmou-se o diagnóstico de HB.

A variante foi encontrada nos filhos (homem de 24 anos e mulher de 34 anos) e em um irmão (59 anos) da paciente: todos saudáveis, normotensos, com potássio normal e rastreio negativo para HP (Figura 13). Essa variante foi encontrada também em um irmão da paciente de 60 anos com diagnóstico de HA aos 59 anos, mas com rastreio negativo para HP.

Figura 13 - Segregação familiar e eletroferograma da variante p.Arg14Leu do GNAS. A, Heredograma mostrando segregação familiar da variante p.Arg14Leu do GNAS. Preenchimento preto, indivíduo portador de HP; Preenchimento cinza, indivíduo portador de HA; Seta, caso índice. B, Eletroferograma da variante p.Arg14Leu do GNAS por sequenciamento pelo método de Sanger. WT, *wild type*

4.2.2 Análise das variantes germinativas em canais de cálcio em pacientes com HU

4.2.2.1 Gene *CACNA1I*: c.6388C>A; p.Leu2095Ile

O gene *CACNA1I* está localizado no cromossomo 22q13 e codifica a subunidade α 1I do canal de cálcio do tipo T, Cav3.3. Ele é altamente expresso em glândulas suprarrenais normais, segundo dados do GTEx. O *CACNA1I* ainda não foi associado ao fenótipo de HP. Recentemente, polimorfismos neste gene foram associados à esquizofrenia⁶⁷.

A variante germinativa em heterozigose p.Leu2095Ile no exon 37 do *CACNA1I* é rara (MAF de 0,05% no GenomAD, descrita apenas entre africanos), altera um aminoácido altamente conservado entre as espécies e é deletéria em mais de três algoritmos de predição *in silico* (Quadro 7). Essa variante foi identificada em um paciente masculino, com diagnóstico de HP aos 50 anos (Caso 2 do Quatro 2) e antecedente de HA desde os 30 anos (Figura 14). O paciente apresentava hipocalemia ao diagnóstico, aldosterona 49 ng/dL, APR 0,13 ng/mL/h e A/APR 379. Na TC apresentava nódulo de 1,3 cm à esquerda com adrenal direita normal. Foi submetido a adrenalectomia esquerda, evoluindo com cura bioquímica do HP e melhora do controle pressórico. A análise anatomopatológica revelou hiperplasia micronodular com micronódulos positivos para CYP11B2 na IHQ, confirmando o diagnóstico de HU. O paciente está em seguimento há 4 anos sem recorrência da doença. Não foi possível contactar os familiares para segregação familiar.

Figura 14 - Eletroferograma da variante p.Leu2095Ile do *CACNA1H* obtido através de sequenciamento pelo método Sanger

4.2.2.2 Gene *CACNA1H*: c.5428-3C>T

O gene *CACNA1H* está localizado no cromossomo 16p13 e codifica a subunidade α 1H do canal de cálcio do tipo T, Cav3.2. O *CACNA1H* apresenta elevada expressão em adrenais normais, segundo dados do GTEx. Este gene já foi associado ao fenótipo de HF tipo IV (Tabela 2) e uma variante germinativa em heterozigose p.Val1951Glu no *CACNA1H* foi descrita em um paciente com aldosteronoma^{45,47}.

A variante germinativa em heterozigose c.5428-3C>T localizada no intron 31 do *CACNA1H* nunca foi descrita, está localizada em região de *splicing* e é deletéria em dois algoritmos de predição *in silico* (Quadro 7). Essa variante foi identificada em um paciente masculino com diagnóstico de HP aos 52 anos (Caso 1 do Quadro 2) e antecedente de HA desde os 46 anos (Figura 15). O paciente apresentava hipocalemia ao diagnóstico, aldosterona plasmática 24,9 ng/dL, APR 0,07 ng/mL/h e A/APR 356. A TC mostrou adrenais normais. Foi submetido a CVA com lateralização à direita. O paciente foi submetido a adrenalectomia direita, evoluindo

com cura bioquímica do HP e melhora do controle pressórico. A análise anatomopatológica revelou hiperplasia micronodular com micronódulos positivos para CYP11B2 na IHQ, confirmando o diagnóstico de HU. O paciente está em seguimento há 6 anos, sem recorrência da doença. Não foi possível contactar os familiares para segregação familiar.

Figura 15 - Eletroferograma da variante c.5428-3C>T do *CACNA1H* obtido através de sequenciamento pelo método Sanger

4.3 Avaliação Imunohistoquímica

A expressão da CYP11B2 foi detectada em micronódulos das hiperplasias adrenais (Quadro 8 e Figura 16). A PDE2A foi fortemente expressa nas áreas hiperplásicas e micronódulos das hiperplasias adrenais; no córtex adrenal normal, a expressão da PDE2A foi evidenciada exclusivamente na zona glomerulosa (Figura 17). Entre os casos de HU, 4 de 5 casos apresentaram imunorreatividade forte para PDE2A. Imunoexpressão forte para PDE2A foi evidenciada em 4 de 6 HBs (Quadro 8). A expressão da PDE2A na hiperplasia adrenal da paciente carreadora da variante germinativa p.Ile629Val da *PDE2A* não diferiu dos demais casos. A PDE1A e PDE3B tiveram uma marcação fraca, com interpretação difícil e duvidosa.

Quadro 8 - Avaliação imunohistoquímica para PDE2A e CYP11B2 nas hiperplasias adrenais corticais unilaterais e bilaterais

Casos HU	PDE2A	CYP11B2
1	+++ (ZG)	micronódulos
2	++++ (ZG e micronódulos)	micronódulos
3	++ (ZG)	micronódulos
4	++++ (ZG)	micronódulos
5	+++ (ZG subcapsular)	micronódulos
Casos HB	PDE2A	CYP11B2
1	+++ (ZG subcapsular e micronódulos)	micronódulos
2	++++ (ZG e micronódulos)	micronódulos
3	++++ (ZG e micronódulos)	micronódulos e nódulo dominante
4	+++ (ZG e micronódulos)	micronódulos
5	++ (ZG subcapsular e micronódulos)	micronódulos
6	++ (ZG)	micronódulos

+, <25% das células com expressão positiva; ++, de 25 a 50% das células com expressão positiva; +++, de 50 a 75% das células com expressão positiva e +++, >75% das células com expressão positiva; ZG, zona glomerulosa.

Figura 16 - Expressão da CYP11B2 na zona glomerulosa normal (A), hiperplasia adrenal cortical bilateral (B, Caso 4 do Quadro 3) e aldosteronoma (C)

Figura 17 - Expressão da PDE2A na zona glomerulosa normal (A), hiperplasia adrenal cortical bilateral (B, Caso 4 do Quadro 3) e aldosteronoma (C)

4.4 Estudos Funcionais

4.4.1 Atividade da PKA em tecido adrenal congelado

A atividade da PKA foi significativamente maior nas HBs dos pacientes com a variante p.Ile629Val da *PDE2A* (Caso 4 do Quadro 3) e com a variante p.Gly392Val da *PDE3B* (Caso 3 do Quadro 3) em comparação à adrenal normal (Gráfico 1). O caso com a variante p.Arg217Gln da *PDE3B* não tinha tecido congelado suficiente para a análise da atividade da PKA. A atividade da PKA na HU do paciente com a variante c.5428-3C>T no *CACNA1H* (Caso 1 do Quadro 2) também estava aumentada em relação à adrenal normal. Dois aldosteronomas (ambos com VPs no *KCNJ5*) apresentaram atividade da PKA similar à adrenal normal e ao controle positivo.

Gráfico 1 - Atividade da PKA em aldosteronomas com variante patogênica no *KCNJ5* e em hiperplasias adrenais corticais unilaterais e bilaterais. *, $p < 0,05$ comparado à adrenal normal

4.4.2 Avaliação da expressão gênica do *SGK1*

A aldosterona é o mais importante regulador da quinase 1 regulada por glicocorticoide (*SGK1*), que em seguida aumenta a expressão do canal de sódio epitelial (*ENaC*)⁶⁸. A expressão da *SGK1* foi significativamente maior nas HBs de pacientes com variantes na *PDE2A* (p.Ile629Val) e *PDE3B* (p.Arg217Gln e p.Gly392Val) quando comparada à aldosteronomas de pacientes sem variantes nas PDEs (Gráfico 2). O aumento da expressão da *SGK1* não foi significativo em dois casos de HB (casos sem variantes de interesse no SPLE).

Gráfico 2 - Expressão gênica do *SGK1* em hiperplasias adrenais corticais bilaterais e aldosteronomas. *, $p < 0,05$ comparado aos aldosteronomas

4.4.3 Avaliação funcional das variantes na *PDE2A* e *PDE3B* *in vitro*

Foram selecionadas as variantes p.Ile629Val no gene *PDE2A* e as variantes p.Arg217Gln e p.Gly392Val no gene *PDE3B* para realizarmos o estudo funcional em colaboração com laboratório do Dr. Stratakis (NICHD, NIH). A variante p.Ala59Val no gene *PDE1A* não foi avaliada, pois não se obteve sucesso na mutagênese. Inicialmente, avaliou-se a expressão proteica em células HEK 293T transfectadas com vetor mutado e WT. Uma menor expressão proteica da *PDE2A* foi evidenciada nas células transfectadas com plasmídeo p.Ile629Val *PDE2A* em relação às células transfectadas com plasmídeo *PDE2A* humano WT (Figura 18).

Figura 18 - Confirmação da introdução da variante p.Ile629Val no vetor *PDE2A* humano WT por Sanger (A). Avaliação densitométrica da expressão proteica da *PDE2A* (B)

Em relação às variantes no gene *PDE3B* uma menor expressão proteica da *PDE3B* também foi encontrada nas células transfectadas com plasmídeo p.Arg217Gln *PDE3B* e p.Gly392Val *PDE3B* em relação às células transfectadas com plasmídeo *PDE3B* humano WT (Figura 19).

Figura 19 - Confirmação por Sanger da introdução das variantes p.Arg217Gln (A) e p.Gly392Val (B) no vetor *PDE3B* humano WT. Avaliação densitométrica da expressão proteica da *PDE3B* (C)

Em relação à atividade da via da PKA, não foi encontrada diferença significativa após indução pelo AMPc nas células transfectadas com plasmídeo p.Ile629Val *PDE2A* em relação às células transfectadas com plasmídeo *PDE2A* humano WT (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Atividade da via da PKA após indução pelo AMPc nas células transfectadas com o mutante Ileu629Val da *PDE2A*

EV, empty vector; WT, wild type

De forma similar, não houve diferença significativa da atividade da PKA após indução pelo AMPc nas células transfectadas com plasmídeo p.Arg217Gln *PDE3B* e p.Gly392Val *PDE3B* em relação às células transfectadas com plasmídeo *PDE3B* humano WT (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Atividade da via da PKA após indução pelo AMPc nas células transfectadas com os mutantes Arg217Gln e Gly329Val da *PDE3B*.

EV, empty vector; WT, wild type

Em seguida, foi analisada a expressão proteica de SGK1 e da subunidade gama do canal de sódio epitelial (SCNN1G ou ENaCg), o alvo final da aldosterona para aumentar a reabsorção renal de sódio. Nas células transfectadas com plasmídeo p.Ile629Val *PDE2A*, não houve alteração da expressão proteica de SGK1. Em relação às variantes no gene *PDE3B*, observou-se um aumento estatisticamente significativo da expressão proteica de SGK1 nas células transfectadas com plasmídeo p.Arg217Gln *PDE3B*. As células transfectadas com plasmídeo p.Gly392Val *PDE3B* tiveram um aumento da expressão proteica de SGK1, porém sem significância estatística (Figura 20).

Figura 20 - Expressão proteica de SGK1. A variante p.Ile629Val da *PDE2A* não modificou a expressão de SGK1 nas células HEK 293T (A), enquanto as variantes p.Arg217Gln e p.Gly392Val da *PDE3B* aumentaram a expressão da SGK1 quando comparado ao PDE3B WT (B). WT, *wild type*

A variante p.Ile629Val da *PDE2A* não aumentou significativamente a expressão da SCNN1G nas células transfectadas. Em contraste, um aumento significativo da expressão da SCNN1G foi evidenciado nas células transfectadas com a variante p.Arg217Gln da *PDE3B*. A variante p.Gly392Val da *PDE3B* aumentou a expressão de SCNN1G, porém sem significância estatística (Figura 21).

Figura 21 - Expressão proteica da SCNN1G após a transfecção com o mutante p.Ile629Val *PDE2A* (A) e com os mutantes p.Arg217Gln e p.Gly392Val da *PDE3B* (B) em células HEK 293T

4.4.4 Compilação das características clínicas dos pacientes com os achados da imunohistoquímica e sequenciamento exômico

Quadro 9 - Compilação dos resultados dos cinco casos de hiperaldosteronismo primário por hiperplasia adrenal cortical unilateral

	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5
Sexo	M	M	M	F	M
Idade ao Diagnóstico (anos)	52	50	46	74	52
Hipocalemia	S	S	S	ND	S
A/APR	355,7	379	103,1	119	91
TC de adrenais					
D	Normal	Normal	Espessada	Normal	Nódulo 1,3 cm
E	Normal	Nódulo 1,3 cm	Espessada	Espessada	Normal
Cateterismo de veias adrenais	L	NR	L	NR	CI
Lado da lesão	D	E	D	E	D
Secreção autônoma de cortisol	NR	NR	NR	NR	N
Cura HP	S	S	S	S	S
Cura HA	N	N	N	N	N
Achado AP	Hiperplasia	Hiperplasia	Hiperplasia	Hiperplasia	Hiperplasia
IHQ PDE2A	+++	++++	++	++++	+++
IHQ CYP11B2	micronódulos	micronódulos	micronódulos	micronódulos	micronódulos
SPLE - variantes germinativas	c.5428-3C>T (CACNA1H)	p.Leu2095Ile (CACNA1I)	-	p.Ala59Val (PDE1A)	-

M, masculino; F, feminino; S, sim; N, não; ND, não disponível; A/APR, relação aldosterona/atividade plasmática de renina; TC, tomografia computadorizada; D, adrenal direita; E, adrenal esquerda; HP, hiperaldosteronismo primário; HA, hipertensão arterial; NR, não realizou; CI, cateterização inadequada; L, lateralização; PB, produção bilateral; IHQ, Imunohistoquímica; AP, Anatomopatológico.

Quadro 10 - Compilação dos resultados dos seis casos de hiperaldosteronismo primário por hiperplasia adrenal cortical bilateral

	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6
Sexo	F	M	F	F	M	F
Idade ao Diagnóstico (anos)	50	58	56	40	65	68
Hipocalcemia	S	S	S	S	S	S
A/APR	40	116,50	232,50	30,20	34,25	91,00
TC de adrenais						
D	Normal	Nódulo 1,8 cm	Nódulo 1,4 cm	Normal	Normal	Nódulo 1,2 cm
E	Nódulo 1cm	Espessada	Espessada	Nódulo 1,2 cm	Nódulo 1,1 cm	Nódulo 2,0 cm
Cateterismo de veias suprarrenais	NR	I	CI	NR	NR	NR
Secreção autônoma de cortisol	N	N	S	N	NR	NR
Adrenalectomia	E	E	D	E	E	E
Cura HP	N	N	N	N	N	N
Cura HA	N	N	N	N	N	N
Achado AP	Hiperplasia acentuada	Hiperplasia moderada	Hiperplasia com nódulo dominante (1,7 cm)	Hiperplasia moderada	Hiperplasia acentuada	Hiperplasia com nódulo dominante
IHQ PDE2A	+++	++++	++++	+++	++	++
IHQ CYP11B2	micronódulos	micronódulos	micronódulos + nódulo	micronódulos	micronódulos	micronódulos
SPLE - variantes germinativas	p.Arg14Leu (GN4S)	p.Arg217Gln (PDE3B)	p.Gly392Val (PDE3B)	p.Ile629Val (PDE2A)	-	-

M, masculino; F, feminino; S, sim; N, não; A/APR, relação aldosterona/atividade plasmática de renina; TC, tomografia computadorizada; D, adrenal direita; E, adrenal esquerda; HP, hiperaldosteronismo primário; HA, hipertensão arterial; NR, não realizou; CI, cateterização inadequada; I, inconclusivo; IHQ, Imunohistoquímica; AP, Anatomopatológico.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram investigados novos genes envolvidos na patogênese do HP causado por HU ou HB. Trata-se do primeiro estudo genético em uma coorte de hiperplasia adrenal associada ao HP realizado em pacientes brasileiros. Foram avaliadas, inicialmente, VPs somáticas em genes alvo já descritos (*KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* e *CTNNB*). Apenas dois casos de HB apresentaram VPs somáticas previamente descritas no *KCNJ5* (p.Gly151Arg e p.Leu168Arg), porém sem correspondente germinativo. Posteriormente, os 11 pacientes (cinco com HP por HU e seis com HP por HB) tiveram o exoma genotipado por SPLE. Apesar da descrição de VPs somáticas em canais iônicos em micronódulos de HU, poucos avanços foram feitos na elucidação da etiologia genética dessa forma de HP⁵⁸. Adicionalmente, a grande maioria dos casos de HB associados ao HP são considerados esporádicos e não tem etiologia genética definida.

Na análise do exoma, foi realizada uma busca ativa por genes codificadores de canais iônicos e relacionados à hiperplasia adrenal. De forma interessante, foram encontradas quatro variantes germinativas raras em heterozigose em genes codificadores das PDEs: *PDE1A* (p.Ala59Val), *PDE2A* (p.Ile629Val) e *PDE3B* (p.Arg217Gln e p.Gly392Val). A variante germinativa na *PDE1A* foi identificada em paciente com HP causado por HU. Já as variantes na *PDE2A* e *PDE3B* foram identificadas em pacientes com HP causado por HB.

As PDEs são uma família de fosfohidrolases que catalisam de modo seletivo a hidrólise das ligações 3' de fosfato cíclico. Elas desempenham um papel na transdução de sinal regulando as concentrações de nucleotídeos cíclicos intracelulares através da hidrólise de AMPc e/ou GMPc para AMP ou GMP, respectivamente⁶¹. Há 11 tipos de PDEs, que são amplamente distribuídas no organismo, com atividade variável em cada tecido (Figura 22). As PDEs 4, 7 e 8 hidrolisam exclusivamente AMPc; as PDEs 5, 6 e 9 hidrolisam apenas GMPc; as demais hidrolisam tanto AMPc quanto GMPc⁶¹. As PDEs são compostas de uma porção N-terminal (sem função conhecida), dois domínios regulatórios (GAF-A e GAF-B) e um domínio catalítico na porção C-terminal. A PDE2 é a única isoforma conhecida cuja ação catalítica é dependente de GMPc, ou seja, ela promove hidrólise do AMPc a partir do estímulo de GMPc⁶⁹. O GMPc, ao se ligar ao sítio alostérico no domínio regulatório GAF-B, promove atividade catalítica da PDE2 (Figura 23).

Figura 22 - Expressão tecidual das PDEs. Adaptado de Azevedo *et al.*⁶¹

Figura 23 - Estrutura molecular das PDEs. Adaptado de Zoraghi *et al.*⁶⁹

O aumento na concentração de AMPc intracelular leva à ativação da PKA. Essa enzima é composta por duas subunidades: uma regulatória (R), que apresenta alta afinidade pelo AMPc, e uma catalítica (C). Na ausência de AMPc, forma-se um complexo tetramérico R₂C₂, inativando a subunidade C. A ligação do AMPc à subunidade R induz mudanças conformacionais que resultam na dissociação da enzima e consequente liberação da subunidade C, que fosforilará alvos nucleares com elementos responsáveis ao AMPc⁶¹. A via da PKA está envolvida na produção de aldosterona a partir do estímulo do ACTH nas células da zona glomerulosa adrenal, além de promover proliferação celular^{60,61,70}. As PDEs degradam AMPc e/ou GMPc e regulam negativamente as vias da PKA e proteína quinase G (PKG) (Figura 24). VPs germinativas *missense* inativadoras na *PDE11A* e *PDE8B* causam hiperplasia adrenal micronodular bilateral e síndrome de Cushing^{71,72}. Em relação à HA, VPs germinativas *missense* na *PDE3A* foram associadas à HA de origem autossômica dominante com braquidactilia⁷³. Até o momento, as PDEs não foram associadas ao HP.

Figura 24 - Representação esquemática da sinalização e regulação dos nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc). AC, adenil ciclase; ANP, peptídeo natriurético atrial; BNP, peptídeo natriurético tipo B; B-Raf, proteína quinase B-Raf; CNG-channel, canal controlado por nucleotídeo cíclico; CNP, peptídeo natriurético tipo C; pGC, guanilato ciclase particulado; PKG, proteína quinase dependente de GMPc; Rap, proteína relacionada a Ras; sAC, adenil ciclase solúvel; sGC, guanilato ciclase solúvel. Adaptado de Azevedo *et al.*⁶¹

No presente estudo, pode-se observar uma forte expressão da PDE2A exclusivamente na zona glomerulosa de adrenais normais, nódulos hiperplásicos e em aldosteronomas. Assim sendo, a PDE2A configura-se como um marcador das células glomerulosas adrenais. Esses achados corroboram estudo prévio que mostrou a expressão da PDE2A na zona glomerulosa normal⁷⁴. Além disso, a PDE2A tem um papel na regulação de aldosterona *in vitro*⁶⁰. Em situação basal, a atividade da PDE2A é baixa. O efeito da PDE2A sobre a aldosterona se torna mais importante sob estímulo do

peptídeo natriurético atrial (ANP). Em situações de aumento da volemia, há aumento do ANP que ativa a enzima guanilato ciclase, aumentando a síntese de GMPc, que, por sua vez, ativa a ação catalítica da PDE2A. A ativação da PDE2A resulta em hidrólise do AMPc fazendo *down-regulation* na via da PKA, reduzindo assim a produção de aldosterona⁶⁰. Dessa forma, a perda da atividade da PDE2A levaria a perda desse mecanismo de *downregulation* e aumentaria a produção de aldosterona.

Além disso, evidências recentes demonstraram que a hiperplasia progressiva da zona glomerulosa na presença de mutações somáticas de ganho de função no gene da beta-catenina resulta de um bloqueio na capacidade das células da zona glomerulosa em se transdiferenciarem em células da zona fasciculada, que é exacerbada quando combinada com um estímulo proliferativo. O estudo indicou que a PDE2A é um alvo direto da via de sinalização Wnt/b-catenina e pode funcionar, pelo menos em parte, como um inibidor de zona fasciculada suprimindo a sinalização AMPc/PKA. De forma interessante, houve um aumento da expressão de PDE2A nas adrenais com ganho de função da beta-catenina⁷⁵.

A variante p.Ile629Val da *PDE2A* foi identificada em uma paciente com HP por HB e HA diagnosticada antes do 20 anos. Ao longo do seguimento, essa paciente teve diagnóstico de neoplasia tireoideana folicular de potencial maligno incerto e carcinoma renal de células claras. A expressão para a PDE2A foi avaliada por IHQ no tecido tireoidiano tumoral e normal adjacente dessa paciente, mas a imunorreatividade para PDE2A foi ausente. A avaliação funcional dessa variante revelou uma menor expressão proteica da PDE2A mutante. No tecido hiperplásico da paciente com a variante da PDE2A, a atividade da PKA foi significativamente maior que na adrenal normal, outros casos de hiperplasias e aldosteronomas. No entanto, a

presença da p.Ile629Val na *PDE2A* não alterou a atividade da via da PKA *in vitro* em células HEK 293T. A variante germinativa *missense* p.Ile629Val na *PDE2A* foi também identificada na mãe do caso índice, portadora de HA e sem HP. Vale ressaltar que a ausência de HP na mãe carreadora da variante p.Ile629Val na *PDE2A* não exclui a sua patogenicidade, já que penetrância incompleta já foi descrita em HF associado a VPs germinativas no *CACNA1H* e *CLCN2*^{39,45}.

Em relação às variantes no gene *PDE3B*, pode-se observar que as variantes p.Arg217Gln e p.Gly392Val na *PDE3B* levaram a uma menor expressão proteica da *PDE3B* quando comparada com a *PDE3B* WT. Em relação a avaliação da via da PKA em tecido adrenal congelado, foi encontrada uma maior atividade da PKA no tecido adrenal hiperplásico do paciente carreador da variante p.Gly392Val. O tecido hiperplásico da paciente carreadora da variante p.Arg217Gln não estava mais disponível para esse estudo. Apesar de identificarmos um aumento da atividade da PKA em tecido adrenal fresco dos pacientes carreadores das variantes germinativas na *PDE2A* e *PDE3B*, esses resultados não foram coincidentes com a avaliação da atividade da PKA em células HEK. A opção pelas células HEK foi feita em virtude de ser uma linhagem celular de transfecção mais fácil, nas quais os experimentos de avaliação da atividade da PKA já estavam padronizados no laboratório do Dr. Constantine Stratakis. No entanto, a discordância entre os estudos em tecido adrenal e *in vitro* tornam necessária a avaliação dos efeitos das variantes na *PDE2A* e *PDE3B* em células adrenais (NCI H295).

A aldosterona aumenta a transcrição de Na⁺/K⁺-ATPase basolateral e do ENaC apical⁷⁶. Após a ligação ao receptor mineralocorticoide citosólico, a aldosterona promove a transcrição de genes regulados pela aldosterona, incluindo o

SGK1. O SGK1 aumenta a atividade do ENaC, por meio da redução da sua ubiquitinação e internalização do receptor⁷⁷. No presente estudo, as variantes na *PDE2A* e *PDE3B* aumentaram a expressão de SGK1 e/ou SCNN1G (ENaCg) a nível de mRNA ou proteína. Esses achados associam a *PDE2A* e *PDE3B* com a sinalização de aldosterona por meio da regulação de SGK1 e ENaC. Além da reabsorção de sódio, um aumento da atividade de SGK1 exacerba o ganho de peso induzido pela dieta, síndrome metabólica e HA⁷⁸. Além disso, a ativação do SGK1 estimula a hipercoagulabilidade, fibrose e inflamação. A aldosterona promove fibrose e inflamação via ativação de SGK1 e NF- κ B, que são inibidos pelo eplerenona⁷⁹. Adicionalmente, um inibidor de SGK1 reverteu o aumento da pressão arterial causado pela hiperinsulinemia e excesso de sal em camundongos⁸⁰.

De forma interessante, variantes em genes codificadores de canais iônicos (*CACNA1H* e *CACNA1I*) foram identificadas somente em pacientes com HU. Nesse estudo, uma nova variante germinativa em sítio de splicing (c.5428-3C>T) no *CACNA1H* foi encontrada em um paciente com HP causado por HU. O gene *CACNA1H* codifica a subunidade α 1H do canal de cálcio voltagem-dependente do tipo T, Cav3.2. Esse gene foi previamente associado ao HF com início do quadro antes de 10 anos⁴⁵. Em 2016, Daniil *et al.*⁴⁷ identificaram novas VPs germinativas (p.Met1549Ile, p.Ser196Leu, p.Val1951Glu e p.Pro2083Leu) no *CACNA1H* em HF diagnosticado após os 20 anos e com padrão de penetrância incompleta. O estudo funcional da variante no *CACNA1H* (c.5428-3C>T) está em andamento por meio de uma colaboração internacional com o Dr. Philippe Lory (CNRS, INSERM, França).

O gene *CACNA1I* codifica a subunidade α 1I do canal de cálcio do tipo T, Cav3.3. Esse gene é altamente expresso em glândulas adrenais normais, segundo

dados do GTEx, mas não foi associado ao fenótipo de HP. Recentemente, polimorfismos neste gene foram associados à esquizofrenia⁶⁷. Foi identificada a variante germinativa p.Leu2095Ile no *CACNAII* em um paciente com HP causado por HU. O estudo funcional dessa variante também está em andamento no laboratório do Dr. Philippe Lory.

Em resumo, pode-se identificar nesse estudo novos genes candidatos para a etiologia genética da HU e HB associadas ao HP. Foi demonstrado que as variantes da *PDE2A* e *PDE3B* estão associadas à patogênese do HP causado por HB. A atividade da PKA estava aumentada no tecido hiperplásico adrenal desses pacientes. Além disso, as variantes da *PDE2A* e *PDE3B* aumentaram a expressão gênica e/ou proteica de SGK1 e SCNN1G/ENaCg, que são os principais mediadores da sinalização da aldosterona. Essas evidências sugerem que as variantes na *PDE2A* e *PDE3B* estão associadas com a patogênese do HP causado por HB. Em relação às variantes no *CACNAIH* e *CACNAII* associadas à HU, espera-se a conclusão de estudos funcionais colaborativos em andamento.

6 CONCLUSÕES

Variantes germinativas raras e provavelmente patogênicas foram identificadas nos genes da *PDE2A* e *PDE3B* em pacientes com HP causado por HB.

A *PDE2A* constitui um marcador de zona glomerulosa e hiperplasia produtora de aldosterona.

Os tecidos hiperplásicos de pacientes com variantes na *PDE2A* e *PDE3B* apresentaram maior atividade da PKA, sugerindo uma perda da capacidade das PDEs mutantes em degradar AMPc.

As variantes da *PDE2A* e *PDE3B* promoveram um aumento da expressão da SGK1 e/ou SCCN1G/ENaCg, que são os principais mediadores da sinalização da aldosterona.

Uma nova variante germinativa no *CACNA1H* (c.5428-3C>T) foi identificada em um paciente com HU associado ao HP.

A variante germinativa (p.Leu2095Ile) no *CACNA1I* foi identificada na HU associada ao HP. O *CACNA1I* surge como um novo gene candidato para o HP.

Anexo A - Protocolo do Cateterismo das Veias Adrenais

- 1 - **Agendamento:** Marcar sempre às quintas com a Dra. Aline Cristine Barbosa. Agendar o cateterismo com 30 dias de antecedência e informar ao Dr. Madson Almeida (celular: 11 98154-9911) para que a compra da ampola de cortrosina (não fornecida pelo HCFMUSP) seja solicitada. Sete dias antes da data agendada, confirmar para o Dr. Madson o agendamento do cateterismo para que o mesmo informe ao Laboratório de Hormônios sobre o envio das amostras na referida data.
- 2 - **Início do procedimento:** O **cateterismo** não deve começar após as 12h para que as amostras não sejam entregues no laboratório após as 16h.
- 3 - **Marcação dos tubos:** O residente **responsável** pelo caso deve levar os tubos a serem utilizados já devidamente etiquetados:
 - Dosagem de cortisol plasmático rápido para avaliar adequação da cateterização da veia adrenal direita (VAD): um tubo de tampa roxa com EDTA com etiqueta marcada **VAD e Periferia**;
 - Dosagem de cortisol e aldosterona em soro da VAD, veia adrenal esquerda (VAE) e da veia cava inferior (VCI): 2 tubos de plástico com gel de tampa vermelha para a **VAD**, 2 tubos para a **VAE** e 2 tubos para a **VCI**.
- 4 - **Estímulo com cortrosina:** Diluir 250 µg de cortrosina em 250 mL de SF 0,9% e infundir 50-100 ml/hora, com início 30 minutos antes do cateterismo e durante todo o exame. A retirada da ampola de cortrosina deve ser combinada com a enfermeira da Endocrinologia (Maria Tereza dos Santos Carvalho) na semana da realização do cateterismo (ligar no ramal 6624 no período da 8-11h).
- 5 - **Dosagem de cortisol plasmático rápida:** Após a cateterização da VAD, devemos coletar da VAD e VCI um tubo de tampa roxa com EDTA para dosagem de cortisol rápida e 2 tubos de plástico com gel de tampa vermelha para dosagem de cortisol e aldosterona séricos. Os tubos de tampa roxa etiquetados com VAD e VCI serão levados até o Laboratório de Hormônios (PAMB 2º andar, Bloco 6). No LIM42, a funcionária Neide Alves ou Poline recepcionará as amostras para fazer a centrifugação. Após a centrifugação, a funcionária Márcia Ester ou Luciana Leopoldino fará a análise e informará o resultado ao residente. Esse processo dura aprox. 30 min. Enquanto aguarda o resultado, a radiologista intervencionista prossegue com a cateterização da VAE e coleta de um tubo de plástico com gel de tampa vermelha para dosagem de cortisol e aldosterona séricos. Se a relação do cortisol na VAD/VCI for ≥ 5 , a cateterização da VAD foi adequada e o cateterismo é encerrado. Após o final do cateterismo, o residente encaminhará os tubos de plástico com gel de tampa vermelha etiquetados com VAD, VAE e VCI para o Laboratório de Hormônios. Se a relação do cortisol na VAD/VCI for < 5 , a cateterização da VAD foi inadequada e a radiologista intervencionista realizará mais uma tentativa de cateterização com coleta de sangue para dosagem de cortisol rápido (repetindo o processo).
- 6 - **Interpretação do resultado:**
 - Após estímulo com ACTH, a relação do cortisol da VAD ou E/VCI deve ser ≥ 5 ;
 - Determinar o quociente aldosterona/cortisol (aldosterona normalizada);
 - **Lateralização:** gradiente ≥ 4 entre as determinações das duas veias suprarrenais, sendo que no lado não-dominante a aldosterona é menor ou igual à da veia cava inferior;
 - **Bilateralidade:** gradiente entre as suprarrenais é < 3 e a relação de aldosterona normalizada das veias suprarrenais com a veia cava inferior é ≥ 1 ;

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

Anexo B - Parecer Consubstanciado do CEP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Madson Almeida

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 46928015.1.0000.0068

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

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.172.979

Data da Relatoria: 05/08/2015

Apresentação do Projeto:

adequada

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar se a prevalência das mutações somáticas nos genes KCNJ5, ATP1A1, ATP2B3 e CACNA1D em aldosteronomas é diferente em Brasileiros, além de investigar novos defeitos genéticos associados com a patogênese molecular dos aldosteronomas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

não há.

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq adm@hc.fm.usp.br

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Aprovado.

Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Apreciação da CONEP: Não.

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

São Paulo, 05 de Agosto de 2015

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

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

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

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

Pesquisador: Madson Almeida

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46928015.1.0000.0068

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

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.159.836

Apresentação do Projeto:

A emenda foi adequadamente apresentada.

Objetivo da Pesquisa:

Solicitação de inclusão da pesquisadora executante Dra. Marcela Rassi da Cruz e do subprojeto intitulado "Investigação genética por sequenciamento paralelo em larga escala do hiperaldosteronismo primário causado por hiperplasia cortical unilateral ou bilateral da suprarrenal".

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos, nem benefícios diretos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador principal solicita a inclusão do nome da pesquisadora executante Dra. Marcela Rassi da Cruz e do subprojeto intitulado "Investigação genética por sequenciamento paralelo em larga escala do hiperaldosteronismo primário causado por hiperplasia cortical unilateral ou bilateral da suprarrenal".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador principal apresentou todos os documentos e justificativas para a solicitação da inclusão do subprojeto e do nome da pesquisadora.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 2.159.836

Recomendações:

Não há recomendações a serem cumpridas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_947173 E1.pdf	28/06/2017 12:49:37		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Doc2.pdf	28/06/2017 12:48:50	Madson Almeida	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoMarcela.pdf	28/06/2017 12:47:57	Madson Almeida	Aceito
Outros	Cadastro de Protocolo de Pesquisa.pdf	16/04/2015 17:22:20		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.pdf	16/04/2015 17:21:32		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Tese Leticia Assis_2015.docx	24/03/2015 16:11:08		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	24/03/2015 15:29:52		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 06 de Julho de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

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

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **Investigação de mutações somáticas em adenomas corticais de suprarrenal produtores de aldosterona**

PESQUISADOR: **Dr. Madson Queiroz de Almeida**

CARGO/FUNÇÃO: **Médico - INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 102257**

UNIDADE DO HCFMUSP: **Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento - Laboratório de Hormônios LIM-42**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐	RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐	RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: **48 meses**

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

1 - Justificativa e os objetivos da pesquisa: O Sr. (a) é portador de um tumor na glândula suprarrenal (uma pequena glândula produtora de hormônios localizada acima do rim. O Sr. (a) está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é pesquisar genes (que são estruturas presentes em todas as células do corpo e que dão as características às pessoas que estão envolvidos no desenvolvimento dos tumores da glândula suprarrenal. Gostaríamos de consultar se o Sr. (a) concordaria em participar do estudo através da doação de amostras do tumor, que serão obtidas durante ato cirúrgico. A participação neste estudo é voluntária (não obrigatória e o seu tratamento será realizado mesmo que o Sr. (a) decida não participar da pesquisa.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

12 - O material coletado neste projeto será armazenado no laboratório e não será descartado após o fim desta pesquisa. O tempo de armazenamento do material será autorizado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq). Futuras pesquisas serão realizadas com o objetivo de compreender melhor a formação dos tumores adrenais e tentar descobrir novas formas de tratamento:

Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?

(..... SIM. Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.

(.... NÃO. Eu dispenso a autorização para cada pesquisa e estou informado(a que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Investigação de mutações somáticas em adenomas corticais de suprarrenal produtores de aldosterona**”

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

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

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data: 02/02/2015

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

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

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

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

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

Anexo E - Critérios de classificação de patogenicidade das ferramentas *in silico* utilizadas na VCF

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

8 REFERÊNCIAS

1. Murray CJ, Lopez AD. Measuring the global burden of disease. *N Engl J Med*. 2013;369(5):448-57.
2. Egan BM, Zhao Y, Axon RN. US trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension, 1988-2008. *JAMA*. 2010;303(20):2043-50.
3. Hannemann A, Wallaschofski H. Prevalence of primary aldosteronism in patient's cohorts and in population-based studies--a review of the current literature. *Horm Metab Res*. 2012;44(3):157-62.
4. Plouin PF, Amar L, Chatellier G. Trends in the prevalence of primary aldosteronism, aldosterone-producing adenomas, and surgically correctable aldosterone-dependent hypertension. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(4):774-7.
5. Douma S, Petidis K, Doumas M, Papaefthimiou P, Triantafyllou A, Kartali N, Papadopoulos N, Vogiatzis K, Zamboulis C. Prevalence of primary hyperaldosteronism in resistant hypertension: a retrospective observational study. *Lancet*. 2008;371(9628):1921-6.
6. Calhoun DA, Nishizaka MK, Zaman MA, Thakkar RB, Weissmann P. Hyperaldosteronism among black and white subjects with resistant hypertension. *Hypertension*. 2002;40(6):892-6.

7. Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD, White A, Cushman WC, White W, Sica D, Ferdinand K, Giles TD, Falkner B, Carey RM; American Heart Association Professional Education Committee. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Circulation*. 2008;117(25):e510-26.
8. Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, Shibata H, Stowasser M, Young WF Jr. The management of primary aldosteronism: case detection, diagnosis, and treatment: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(5):1889-916.
9. Milliez P, Girerd X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(8):1243-8.
10. Stowasser M, Sharman J, Leano R, Gordon RD, Ward G, Cowley D, Marwick TH. Evidence for abnormal left ventricular structure and function in normotensive individuals with familial hyperaldosteronism type I. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(9):5070-6.
11. Savard S, Amar L, Plouin PF, Steichen O. Cardiovascular complications associated with primary aldosteronism: a controlled cross-sectional study. *Hypertension*. 2013;62(2):331-6.

12. Mulatero P, Monticone S, Bertello C, Viola A, Tizzani D, Iannaccone A, Crudo V, Burrello J, Milan A, Rabbia F, Veglio F. Long-term cardio- and cerebrovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(12):4826-33.
13. Fallo F, Veglio F, Bertello C, Sonino N, Della Mea P, Ermani M, Rabbia F, Federspil G, Mulatero P. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(2):454-9.
14. Chen W, Li F, He C, Zhu Y, Tan W. Elevated prevalence of abnormal glucose metabolism in patients with primary aldosteronism: a meta-analysis. *Ir J Med Sci.* 2014;183(2):283-91.
15. Rossi GP, Ceolotto G, Rossitto G, Seccia TM, Maiolino G, Berton C, Basso D, Plebani M. Prospective validation of an automated chemiluminescence-based assay of renin and aldosterone for the work-up of arterial hypertension. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(9):1441-5.
16. Vilela LAP, Almeida MQ. Diagnosis and management of primary aldosteronism. *Arch Endocrinol Metab.* 2017;61(3):305-12.
17. Morera J, Reznik Y. Management of endocrine disease: the role of confirmatory tests in the diagnosis of primary aldosteronism. *Eur J Endocrinol.* 2019;180(2):R45-R58.

18. Rossi GP, Bernini G, Caliumi C, Desideri G, Fabris B, Ferri C, Ganzaroli C, Giacchetti G, Letizia C, Maccario M, Mallamaci F, Mannelli M, Mattarello MJ, Moretti A, Palumbo G, Parenti G, Porteri E, Semplicini A, Rizzoni D, Rossi E, Boscaro M, Pessina AC, Mantero F; PAPY Study Investigators. A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(11):2293-300.
19. Rossi GP, Bolognesi M, Rizzoni D, Seccia TM, Piva A, Porteri E, Tiberio GA, Giulini SM, Agabiti-Rosei E, Pessina AC. Vascular remodeling and duration of hypertension predict outcome of adrenalectomy in primary aldosteronism patients. *Hypertension*. 2008;51(5):1366-71.
20. Catena C, Colussi G, Lapenna R, Nadalini E, Chiuch A, Gianfagna P, Sechi LA. Long-term cardiac effects of adrenalectomy or mineralocorticoid antagonists in patients with primary aldosteronism. *Hypertension*. 2007;50(5):911-8.
21. Williams TA, Lenders JWM, Mulatero P, Burrello J, Rottenkolber M, Adolf C, Satoh F, Amar L, Quinkler M, Deinum J, Beuschlein F, Kitamoto KK, Pham U, Morimoto R, Umakoshi H, Prejbisz A, Kocjan T, Naruse M, Stowasser M, Nishikawa T, Young WF Jr, Gomez-Sanchez CE, Funder JW, Reincke M; Primary Aldosteronism Surgery Outcome (PASO) investigators. Outcomes after adrenalectomy for unilateral primary aldosteronism: an international consensus on outcome measures and analysis of remission rates in an international cohort. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5(9):689-699.
22. Celen O, O'Brien MJ, Melby JC, Beazley RM. Factors influencing outcome of surgery for primary aldosteronism. *Arch Surg*. 1996;131(6):646-50.

23. Sawka AM, Young WF, Thompson GB, Grant CS, Farley DR, Leibson C, van Heerden JA. Primary aldosteronism: factors associated with normalization of blood pressure after surgery. *Ann Intern Med.* 2001;135(4):258-61.
24. Vilela LAP, Rassi-Cruz M, Guimaraes AG, Moises CCS, Freitas TC, Alencar NP, Petenuci J, Goldbaum TS, Maciel AAW, Pereira MAA, Silva GV, Pio-Abreu A, Zerbini MCN, Cavalcante ACBS, Carnevale FC, Pilan B, Yamauchi F, Srougi V, Tanno FY, Chambo JL, Latronico AC, Mendonca BB, Fragoso MCBV, Bortolotto LA, Drager LF, Almeida MQ. KCNJ5 somatic mutation is a predictor of hypertension remission after adrenalectomy for unilateral primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(10):4695-702.
25. Wambach G, Helber A, Bonner G, Hummerich W, Meurer KA, Kaufmann W. Spironolactone in essential hypertension associated with abnormal aldosterone regulation and in Conn's syndrome (author's transl). *Dtsch Med Wochenschr.* 1980;105(18):647-51.
26. Burgess ED, Lacourciere Y, Ruilope-Urioste LM, Oparil S, Kleiman JH, Krause S, Roniker B, Maurath C. Long-term safety and efficacy of the selective aldosterone blocker eplerenone in patients with essential hypertension. *Clin Ther.* 2003;25(9):2388-404.
27. Hundemer GL, Curhan GC, Yozamp N, Wang M, Vaidya A. Cardiometabolic outcomes and mortality in medically treated primary aldosteronism: a retrospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6(1):51-9.

28. Zennaro MC, Rickard AJ, Boulkroun S. Genetics of mineralocorticoid excess: an update for clinicians. *Eur J Endocrinol*. 2013;169(1):R15-25.
29. Zennaro MC, Boulkroun S, Fernandes-Rosa F. An update on novel mechanisms of primary aldosteronism. *J Endocrinol*. 2015;224(2):R63-77.
30. Choi M, Scholl UI, Yue P, Bjorklund P, Zhao B, Nelson-Williams C, Ji W, Cho Y, Patel A, Men CJ, Lolis E, Wisgerhof MV, Geller DS, Mane S, Hellman P, Westin G, Åkerström G, Wang W, Carling T, Lifton RP. K⁺ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science*. 2011;331(6018):768-72.
31. Pallauf A, Schirpenbach C, Zwermann O, Fischer E, Morak M, Holinski-Feder E, Hofbauer L, Beuschlein F, Reincke M. The prevalence of familial hyperaldosteronism in apparently sporadic primary aldosteronism in Germany: a single center experience. *Horm Metab Res*. 2012;44(3):215-20.
32. Sutherland DJ, Ruse JL, Laidlaw JC. Hypertension, increased aldosterone secretion and low plasma renin activity relieved by dexamethasone. *Can Med Assoc J*. 1966;95(22):1109-19.
33. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S, Lalouel JM. A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature*. 1992;355(6357):262-5.
34. Litchfield WR, New MI, Coolidge C, Lifton RP, Dluhy RG. Evaluation of the dexamethasone suppression test for the diagnosis of glucocorticoid-remediable aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(11):3570-3.

35. Dluhy RG, Anderson B, Harlin B, Ingelfinger J, Lifton R. Glucocorticoid-remediable aldosteronism is associated with severe hypertension in early childhood. *J Pediatr*. 2001;138(5):715-20.
36. Dluhy RG, Lifton RP. Glucocorticoid-remediable aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(12):4341-4.
37. Lafferty AR, Torpy DJ, Stowasser M, Taymans SE, Lin JP, Huggard P, Gordon RD, Stratakis CA. A novel genetic locus for low renin hypertension: familial hyperaldosteronism type II maps to chromosome 7 (7p22). *J Med Genet*. 2000;37(11):831-5.
38. Fernandes-Rosa FL, Daniil G, Orozco IJ, Goppner C, El Zein R, Jain V, Boulkroun S, Jeunemaitre X, Amar L, Lefebvre H, Schwarzmayer T, Strom TM, Jentsch TJ, Zennaro MC. A gain-of-function mutation in the CLCN2 chloride channel gene causes primary aldosteronism. *Nat Genet*. 2018;50(3):355-61.
39. Scholl UI, Stolting G, Schewe J, Thiel A, Tan H, Nelson-Williams C, Vichot AA, Jin SC, Loring E, Untiet V, Yoo T, Choi J, Xu S, Wu A, Kirchner M, Mertins P, Rump LC, Onder AM, Gamble C, McKenney D, Lash RW, Jones DP, Chune G, Gagliardi P, Choi M, Gordon R, Stowasser M, Fahlke C, Lifton RP. CLCN2 chloride channel mutations in familial hyperaldosteronism type II. *Nat Genet*. 2018;50(3):349-54.
40. Geller DS, Zhang J, Wisgerhof MV, Shackleton C, Kashgarian M, Lifton RP. A novel form of human mendelian hypertension featuring nonglucocorticoid-remediable aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(8):3117-23.

41. Scholl UI, Nelson-Williams C, Yue P, Grekin R, Wyatt RJ, Dillon MJ, Couch R, Hammer LK, Harley FL, Farhi A, Wang WH, Lifton RP. Hypertension with or without adrenal hyperplasia due to different inherited mutations in the potassium channel KCNJ5. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(7):2533-8..
42. Charmandari E, Sertedaki A, Kino T, Merakou C, Hoffman DA, Hatch MM, Hurt DE, Lin L, Xekouki P, Stratakis CA, Chrousos GP. A novel point mutation in the KCNJ5 gene causing primary hyperaldosteronism and early-onset autosomal dominant hypertension. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(8):E1532-9.
43. Monticone S, Hattangady NG, Penton D, Isales CM, Edwards MA, Williams TA, Sterner C, Warth R, Mulatero P, Rainey WE. A Novel Y152C KCNJ5 mutation responsible for familial hyperaldosteronism type III. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(11):E1861-5.
44. Mulatero P, Monticone S, Rainey WE, Veglio F, Williams TA. Role of KCNJ5 in familial and sporadic primary aldosteronism. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(2):104-12.
45. Scholl UI, Stolting G, Nelson-Williams C, Vichot AA, Choi M, Loring E, Prasad ML, Goh G, Carling T, Juhlin CC, Quack I, Rump LC, Thiel A, Lande M, Frazier BG, Rasoulpour M, Bowlin DL, Sethna CB, Trachtman H, Fahlke C, Lifton RP. Recurrent gain of function mutation in calcium channel CACNA1H causes early-onset hypertension with primary aldosteronism. *Elife*. 2015;4:e06315.

46. Reimer EN, Walenda G, Seidel E, Scholl UI. CACNA1H(M1549V) Mutant Calcium Channel Causes Autonomous Aldosterone Production in HAC15 Cells and Is Inhibited by Mibefradil. *Endocrinology*. 2016;157(8):3016-22.
47. Daniil G, Fernandes-Rosa FL, Chemin J, Blesneac I, Beltrand J, Polak M, Jeunemaitre X, Boulkroun S, Amar L, Strom TM, Lory P, Zennaro MC. CACNA1H Mutations are associated with different forms of primary aldosteronism. *EBioMedicine*. 2016;13:225-36.
48. Fernandes-Rosa FL, Williams TA, Riester A, Steichen O, Beuschlein F, Boulkroun S, Strom TM, Monticone S, Amar L, Meatchi T, Mantero F, Cicala MV, Quinkler M, Fallo F, Allolio B, Bernini G, Maccario M, Giacchetti G, Jeunemaitre X, Mulatero P, Reincke M, Zennaro MC. Genetic spectrum and clinical correlates of somatic mutations in aldosterone-producing adenoma. *Hypertension*. 2014;64(2):354-61.
49. Beuschlein F, Boulkroun S, Osswald A, Wieland T, Nielsen HN, Lichtenauer UD, enton D, Schack VR, Amar L, Fischer E, Walther A, Tauber P, Schwarzmayr T, Diener S, Graf E, Allolio B, Samson-Couterie B, Benecke A, Quinkler M, Fallo F, Plouin PF, Mantero F, Meitinger T, Mulatero P, Jeunemaitre X, Warth R, Vilsen B, Zennaro MC, Strom TM, Reincke M . Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension. *Nat Genet*. 2013;45(4):440-4, 4e1-2.

-
50. Azizan EA, Poulsen H, Tuluc P, Zhou J, Clausen MV, Lieb A, Maniero C, Garg S, Bochukova EG, Zhao W, Shaikh LH, Brighton CA, Teo AE, Davenport AP, Dekkers T, Tops B, Küsters B, Ceral J, Yeo GS, Neogi SG, McFarlane I, Rosenfeld N, Marass F, Hadfield J, Margas W, Chaggar K, Solar M, Deinum J, Dolphin AC, Farooqi IS, Striessnig J, Nissen P, Brown MJ . Somatic mutations in ATP1A1 and CACNA1D underlie a common subtype of adrenal hypertension. *Nat Genet.* 2013;45(9):1055-60.
 51. Scholl UI, Goh G, Stolting G, de Oliveira RC, Choi M, Overton JD, Fonseca AL, Korah R, Starker LF, Kunstman JW, Prasad ML, Hartung EA, Mauras N, Benson MR, Brady T, Shapiro JR, Loring E, Nelson-Williams C, Libutti SK, Mane S, Hellman P, Westin G, Åkerström G, Björklund P, Carling T, Fahlke C, Hidalgo P, Lifton RP . Somatic and germline CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism. *Nat Genet.* 2013;45(9):1050-4.
 52. Berthon A, Martinez A, Bertherat J, Val P. Wnt/ β -catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;351(1):87-95.
 53. Teo AE, Brown MJ. Pregnancy, Primary Aldosteronism, and Somatic CTNNB1 Mutations. *N Engl J Med.* 2016;374(15):1494.
 54. Åkerström T, Maharjan R, Sven Willenberg H, Cupisti K, Ip J, Moser A, Stålberg P, Robinson B, Alexander Iwen K, Dralle H, Walz MK, Lehnert H, Sidhu S, Gomez-Sanchez C, Hellman P, Björklund P. Activating mutations in CTNNB1 in aldosterone producing adenomas. *Sci Rep.* 2016;6:19546.

-
55. Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14:59-88.
56. Zilbermint M, Xekouki P, Faucz FR, Berthon A, Gkourogianni A, Scherthaner-Reiter MH, Batsis M, Sinaii N, Quezado MM, Merino M, Hodes A, Abraham SB, Libé R, Assié G, Espiard S, Drougat L, Ragazzon B, Davis A, Gebreab SY, Neff R, Kebebew E, Bertherat J, Lodish MB, Stratakis CA. Primary Aldosteronism and ARMC5 Variants. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(6):E900-9.
57. Scholl UI, Healy JM, Thiel A, Fonseca AL, Brown TC, Kunstman JW, Horne MJ, Dietrich D, Riemer J, Kücükköylü S, Reimer EN, Reis AC, Goh G, Kristiansen G, Mahajan A, Korah R, Lifton RP, Prasad ML, Carling T. Novel somatic mutations in primary hyperaldosteronism are related to the clinical, radiological and pathological phenotype. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2015;83(6):779-89.
58. Yamazaki Y, Nakamura Y, Omata K, Ise K, Tezuka Y, Ono Y, Morimoto R, Nozawa Y, Gomez-Sanchez CE, Tomlins SA, Rainey WE, Ito S, Satoh F, Sasano H. Histopathological classification of cross-sectional image-negative hyperaldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(4):1182-92.
59. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24.

-
60. Nikolaev VO, Gambaryan S, Engelhardt S, Walter U, Lohse MJ. Real-time monitoring of the PDE2 activity of live cells: hormone-stimulated cAMP hydrolysis is faster than hormone-stimulated cAMP synthesis. *J Biol Chem.* 2005;280(3):1716-9.
 61. Azevedo MF, Faucz FR, Bimpaki E, Horvath A, Levy I, de Alexandre RB, Ahmad F, Manganiello V, Stratakis CA. Clinical and molecular genetics of the phosphodiesterases (PDEs). *Endocr Rev.* 2014;35(2):195-233.
 62. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
 63. Rohlf C, Clair T, Cho-Chung YS. 8-Cl-cAMP induces truncation and down-regulation of the RI alpha subunit and up-regulation of the RII beta subunit of cAMP-dependent protein kinase leading to type II holoenzyme-dependent growth inhibition and differentiation of HL-60 leukemia cells. *J Biol Chem.* 1993;268(8):5774-82.
 64. Spiessberger B, Bernhard D, Herrmann S, Feil S, Werner C, Lupp PB, Hofmann F. cGMP-dependent protein kinase II and aldosterone secretion. *FEBS J.* 2009;276(4):1007-13.
 65. 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(5):2147-51.

-
66. Nakajima Y, Okamura T, Horiguchi K, Gohko T, Miyamoto T, Satoh T, Ozawa A, Ishii S, Yamada E, Hashimoto K, Okada S, Takata D, Horiguchi J, Yamada M. GNAS mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas. *Endocr J*. 2016;63(2):199-204.
 67. Xie Y, Huang D, Wei L, Luo XJ. Further evidence for the genetic association between CACNA1I and schizophrenia. *Hereditas*. 2018;155:16.
 68. Pearce D. SGK1 regulation of epithelial sodium transport. *Cell Physiol Biochem*. 2003;13(1):13-20.
 69. Zoraghi R, Bessay EP, Corbin JD, Francis SH. Structural and functional features in human PDE5A1 regulatory domain that provide for allosteric cGMP binding, dimerization, and regulation. *J Biol Chem*. 2005;280(12):12051-63.
 70. Monterisi S, Lobo MJ, Livie C, Castle JC, Weinberger M, Baillie G, Surdo NC, Musheshe N, Stangherlin A, Gottlieb E, Maizels R, Bortolozzi M, Micaroni M, Zaccolo M. PDE2A2 regulates mitochondria morphology and apoptotic cell death via local modulation of cAMP/PKA signalling. *Elife*. 2017;6:e21374.
 71. Horvath A, Boikos S, Giatzakis C, Robinson-White A, Groussin L, Griffin KJ, Stein E, Levine E, Delimpasi G, Hsiao HP, Keil M, Heyerdahl S, Matyakhina L, Libè R, Fratticci A, Kirschner LS, Cramer K, Gaillard RC, Bertagna X, Carney JA, Bertherat J, Bossis I, Stratakis CA. A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia. *Nat Genet*. 2006;38(7):794-800.

-
72. Horvath A, Mericq V, Stratakis CA. Mutation in PDE8B, a cyclic AMP-specific phosphodiesterase in adrenal hyperplasia. *N Engl J Med.* 2008;358(7):750-2.
73. Maass PG, Aydin A, Luft FC, Schachterle C, Weise A, Stricker S, Lindschau C, Vaegler M, Qadri F, Toka HR, Schulz H, Krawitz PM, Parkhomchuk D, Hecht J, Hollfinger I, Wefeld-Neuenfeld Y, Bartels-Klein E, Mühl A, Kann M, Schuster H, Chitayat D, Bialer MG, Wienker TF, Ott J, Rittscher K, Liehr T, Jordan J, Plessis G, Tank J, Mai K, Naraghi R, Hodge R, Hopp M, Hattenbach LO, Busjahn A, Rauch A, Vandeput F, Gong M, Rüschenhoff F, Hübner N, Haller H, Mundlos S, Bilginturan N, Movsesian MA, Klusmann E, Toka O, Bähring S. PDE3A mutations cause autosomal dominant hypertension with brachydactyly. *Nat Genet.* 2015;47(6):647-53.
74. Stephenson DT, Coskran TM, Wilhelms MB, Adamowicz WO, O'Donnell MM, Muravnick KB, Menniti FS, Kleiman RJ, Morton D. Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 2A in multiple mammalian species. *J Histochem Cytochem.* 2009;57(10):933-49.
75. Pignatti E, Leng S, Yuchi Y, Borges KS, Guagliardo NA, Shah MS, Ruiz-Babot G, Kariyawasam D, Taketo MM, Miao J, Barrett PQ, Carlone DL, Breault DT. Beta-catenin causes adrenal hyperplasia by blocking zonal transdifferentiation. *Cell Rep.* 2020;31(3):107524.
76. Rossi GM, Regolisti G, Peyronel F, Fiaccadori E. Recent insights into sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: implications on pathophysiology and drug discovery. *J Nephrol.* 2020;33(3):447-66.

77. Staub O, Dho S, Henry P, Correa J, Ishikawa T, McGlade J, Rotin D. WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO J.* 1996;15(10):2371-80.
78. Sierra-Ramos C, Velazquez-Garcia S, Vastola-Mascolo A, Hernandez G, Faresse N, Alvarez de la Rosa D. SGK1 activation exacerbates diet-induced obesity, metabolic syndrome and hypertension. *J Endocrinol.* 2020;244(1):149-62.
79. Terada Y, Kuwana H, Kobayashi T, Okado T, Suzuki N, Yoshimoto T, Hirata Y, Sasaki S. Aldosterone-stimulated SGK1 activity mediates profibrotic signaling in the mesangium. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(2):298-309.
80. Ackermann TF, Boini KM, Beier N, Scholz W, Fuchss T, Lang F. EMD638683, a novel SGK inhibitor with antihypertensive potency. *Cell Physiol Biochem.* 2011;28(1):137-46.

APÊNDICE

Apêndice A - Publicação

06/11/2020

Phosphodiesterase 2A and 3B variants are associated with primary aldosteronism - PubMed

FULL TEXT LINKS

► [Endocr Relat Cancer](#). 2020 Oct 1;ERC-20-0384.R1. doi: 10.1530/ERC-20-0384. Online ahead of print.

Phosphodiesterase 2A and 3B variants are associated with primary aldosteronism

Marcela Rassi-Cruz ¹, Andrea Gutierrez Maria ², Fabio R Faucz ³, Edra London ⁴, Leticia A P Vilela ⁵, Lucas S Santana ⁶, Anna Flavia F Benedetti ⁷, Tatiana S Goldbaum ⁸, Fabio Y Tanno ⁹, Victor Srougi ¹⁰, José Luis Chambó ¹¹, Maria Adelaide Pereira ¹², Aline Cavalcante ¹³, Francisco Carnevale ¹⁴, Bruna Pilan ¹⁵, Luiz Bortolotto ¹⁶, Luciano F Drager ¹⁷, Antonio Mp Lerario ¹⁸, Ana Claudia Latronico ¹⁹, Maria C Fragoso ²⁰, Berenice Bilharinho Mendonça ²¹, Maria Claudia Nogueira Zerbini ²², Constantine A Stratakis ²³, Madson Q Almeida ²⁴

Affiliations

PMID: 33112806 DOI: [10.1530/ERC-20-0384](#)

Abstract

Familial primary aldosteronism (PA) is rare and mostly diagnosed in early-onset hypertension (HT). However, 'sporadic' bilateral adrenal hyperplasia (BAH) is the most frequent cause of PA and remains without genetic etiology in most cases. Our aim was to investigate new genetic defects associated with BAH and PA. We performed whole-exome sequencing (paired blood and adrenal tissue) in 6 patients with PA caused by BAH that underwent unilateral adrenalectomy. Additionally, we conducted functional studies in adrenal hyperplastic tissue and transfected cells to confirm the pathogenicity of the identified genetic variants. Rare germline variants in phosphodiesterase 2A (PDE2A) and 3B (PDE3B) genes were identified in 3 patients. The PDE2A heterozygous variant (p.Ile629Val) was identified in a patient with BAH and early-onset HT at 13 yrs of age. Two PDE3B heterozygous variants (p.Arg217Gln and p.Gly392Val) were identified in patients with BAH and HT diagnosed at 18 and 33 yrs of age, respectively. A strong PDE2A staining was found in all cases of BAH in zona glomerulosa and/or micronodules (that were also positive for CYP11B2). PKA activity in frozen tissue was significantly higher in BAH from patients harboring PDE2A and PDE3B variants. PDE2A and PDE3B variants significantly reduced protein expression in mutant transfected cells compared to WT. Interestingly, PDE2A and PDE3B variants increased SGK1 and SCNN1G/ENaCg at mRNA or protein levels. In conclusion, PDE2A and PDE3B variants were associated with PA caused by BAH. These novel genetic findings expand the spectrum of genetic etiologies of PA.

Related information

[MedGen](#)

LinkOut – more resources

Full Text Sources

[Sheridan PubFactory](#)