Marcia Helena Soares Costa

**Estudo da expressão dos receptores do peptídeo
insulinotrópico dependente de glicose (GIPR) e
do hormônio luteinizante (LHCGR) em tumores e
hiperplasias do córtex adrenal**

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

Área de concentração: Endocrinologia

Orientadora: Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Latrônico Xavier

São Paulo

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, Marcia Helena Soares

Estudo da expressão dos receptores do peptídeo insulínico dependente de glicose (GIPR) e do hormônio luteinizante (LHCGR) em tumores e hiperplasias do córtex adrenal / Marcia Helena Soares Costa.-- São Paulo, 2007.

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

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientadora: Maria Candida Barisson Villares Fragoso.

Co-orientadora: Ana Claudia Latrônico Xavier.

Descritores: 1.Neoplasias do córtex supra-renal 2.Neoplasia endócrina múltipla 3.Hiperfunção do córtex das supra-renais 3.Hiperfunção adrenocortical 4.Receptores de peptídeo 5.Receptores do LH 6.Polipeptídeo inibidor gástrico 7.Expressão gênica 8.Mutação/genética 9.Perda de heterozigossidade 10.Reação em cadeia da polimerase 11.Imunohistoquímica

Este trabalho foi realizado na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com o apoio financeiro parcial da FAPESP (processos: 03/07449-1 e 04/15046-7)

**Ao Adriano, companheiro inseparável de todas
as horas e que suavizou os momentos difíceis
com o prazer de tê-lo ao meu lado.**

**A minha mãe por considerar a educação
a maior herança em vida a seus filhos.**

**Ao meu pai pela serenidade com que educou
seus filhos, nos dando liberdade de escolha
para galgarmos novos caminhos.**

As minhas irmãs pela amizade e cumplicidade.

Ainda que eu fale a língua dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o sino que ressoa ou como o prato que retine. Ainda que eu tenha o dom da profecia e saiba todos os mistérios e todo o conhecimento, e tenha uma fé capaz de mover montanhas, se não tiver amor, nada serei. Assim permaneçam agora estes três: a fé, a esperança e o amor. O maior deles, porém é o amor.

(I Coríntios 13:1-2;13)

**A todos aqueles que plantam seus sonhos
com amor e colhem com sabedoria
profícuas realizações.**

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Esta tese é dedicada a Adriano Monte Pessoa cujo apoio incondicional, amor e dedicação foram fundamentais para concretizá-la. As palavras são singelas para expressar o quanto ele foi importante na minha vida durante todo este período, incentivando meu trabalho, não me deixando fraquejar nunca.

Aos meus pais, Graça e Hernandes, por serem pessoas que vieram de uma família humilde do interior do Maranhão e deram aos seus filhos o maior bem que se pode proporcionar ao ser humano: educação; deram aos seus filhos a oportunidade e a sabedoria de aprender a transformar desejos, em sonhos, lutas e realizações.

As minhas irmãs, Ana Marcia e Virgínia, que me ensinam todos os dias o quanto é importante colocar o ser humano em primeiro lugar e me ajudam a valorizar o convívio familiar acima de tudo; aos meus sobrinhos, Kataryne e Kauã, que nasceram durante o período de realização desta tese e encheram a minha estadia em São Paulo de alegria.

Quero agradecer à minha orientadora, Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso, pela sua colaboração, empenho e dedicação durante todo o trabalho de elaboração desta tese. Posso dizer que ao fim de uma longa jornada, compartilhei com ela momentos de alegria, de satisfação e sobretudo de muito aprendizado que todo este processo me proporcionou.

À Prof. Dra. Ana Claudia Latrônico Xavier, minha co-orientadora, cuja experiência e praticidade foram de fundamental importância para que esta

pesquisa atingisse a sua meta. Agradeço profundamente à Dra. Ana Cláudia pelo auxílio e ajuda em momentos decisivos do andamento deste trabalho.

Todo trabalho científico requer muita perseverança, dedicação, e garra; quando cheguei ao Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 pude observar muito precocemente que, além de todas estas características, existia uma atmosfera de trabalho contagiante, produtiva e sobretudo amistosa. Todo este conjunto reflete a alma da chefe deste laboratório e atual professora titular da disciplina de endocrinologia, Prof. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça, exemplo de dedicação e determinação. Quero agradecê-la pela confiança e pela oportunidade ímpar de desenvolver este trabalho.

No LIM/42 pude encontrar amigos como: Regina Matsunaga Martin, que me ensinou a dar os primeiros passos no processo de extração de RNA. Miriam Yumi Nishi, colaboradora constante nas horas de bancada no PCR em tempo real. Emília Modolo Pinto e a Ana Elisa Billerbeck, fundamentais para solidificação dos meus conhecimentos em biologia molecular. Antônio Marcondes Lerário e Sorahia Domenice, colegas inseparáveis de ambulatório e constantes incentivadores; amigos já familiarizados com o laboratório, mas sempre dispostos a ajudar como: Edna, Lise, Rogério, Rafaela, Tânia, Elaine, Milena Abrão. Lá reencontrei amigos antigos, cujos laços se fortaleceram e com os quais pude compartilhar boas lembranças e novas conquistas como: Karina Berger, Michele Patrocínio Rocha e Flavia Coutinho; também tive oportunidade de fazer novos amigos com os quais

compartilhei novas experiências e dos quais sempre lembro com carinho como: Luciani, Vinícius, Catarina, Milena Teles, Rocio e Fred.

Ao Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge e ao Dr. Ivo Jorge Prado Arnhold, sempre dispostos a ajudar e contribuir com os seus conhecimentos científicos.

Este foi um trabalho em que pude contar com a colaboração de muitas pessoas; Ângela Silva Barbosa gentilmente me ajudou cedendo material de alguns pacientes, com tumor adrenal, incluídos neste trabalho. Dra. Kátia Camarano Nogueira e Delmar Muniz L. Junior cederam material de dois pacientes com MEN 1 incluídos nesta tese; também não posso deixar de agradecer a pessoas como Illeana Rubió, sempre disposta a dar a sua opinião nos experimentos que envolviam o PCR em tempo real. Agradeço também ao Dr. Antônio Marmo Lucon pela imensa colaboração na obtenção dos tecidos utilizados nesta tese.

Ao Prof. Dr. Chin Jia Lin , Prof. Dr. Cláudio E. Kater e a Prof. Dra. Maria Lúcia Gianella que constituíram a banca do exame de qualificação, pelas críticas, elogios e sugestões.

Algumas pessoas são mais que funcionários, passam a ser amigos, colaboradores e torcem muito para que alcancemos os nossos objetivos. Agradeço a Francinilda pela paciência, exemplo de dedicação constante aos pós-graduandos do laboratório, contribuindo significativamente para muitas das nossas vitórias; Valéria, Cássia, Maria Aparecida (Cidinha), Chris, Ana Farat, Alzira pela ajuda e boa vontade habitual.

Mais recentemente tive oportunidade de fazer parte de uma nova família profissional, e no laboratório de fisiopatologia endócrina, do Hôtel Dieu, na Universidade de Montreal, pude aprender um pouco mais com amigos como Antoine, Silvie, e Mimi, bem como conhecer pessoas admiráveis como a Dra. Isabelle Bourdeau cuja gentileza e simplicidade me cativaram.

Tenho imensa gratidão ao Prof. Dr. André Lacroix, no qual pude vislumbrar todas as características de um grande líder; tanta sabedoria, serenidade e compreensão me tocaram enormemente durante a minha estadia em Montreal. Ele e a sua esposa Liliane muito me cativaram pela hospitalidade e inúmeras provas de carinho e amizade.

Só tenho a agradecer; principalmente a Deus pela oportunidade de ter conhecido pessoas tão especiais ao longo da minha trajetória e pedir a ele que continue sendo o guia maior, com sabedoria e conhecimento para zelar pela saúde daqueles que são a razão do nosso trabalho: os nossos pacientes.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Tumores Adrenocorticais	3
1.1.1 Critérios Histopatológicos para Classificação das Neoplasias Adrenocorticais	5
1.1.2 Alterações Moleculares nas Neoplasias Adrenocorticais	6
1.2 Hiperplasia Macronodular Primária	10
1.3 Doença Adrenocortical Nodular Pigmentosa Primária	13
1.4 Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1	15
1.5 Regulação Hormonal do Córtex Adrenal e Receptores Anômalos...	16
1.6 Receptor do Peptídeo Insulinotrópico Dependente de Glicose (GIPR)	20
1.7 Receptor do Hormônio Luteinizante (LHCGR)	21
2. OBJETIVOS	24
3. CASUÍSTICA	26
4. MÉTODOS	30
4.1 Extração de DNA.....	31
4.1.1 Sangue periférico	31
4.1.2. Tecidos.....	31
4.2 Extração de RNA.....	32

4.3	Síntese do DNA Complementar	33
4.4	Reação de Polimerização em Cadeia	33
4.5	Seqüenciamento Automático	36
4.6	Determinação da Perda de Heterozigose (<i>MEN1</i> e <i>PRKAR1A</i>)	37
4.7	Estudo da Expressão do <i>LHCGR</i> e <i>GIPR</i> por PCR em Tempo Real.....	39
4.8	Imunohistoquímica	42
5.	RESULTADOS.....	45
5.1	Gene <i>MEN1</i>	46
5.2	Gene <i>PRKAR1A</i>	49
5.3	Estudo de Microssatélites: Análise de LOH	50
5.3.1	Cromossomo 11 (Gene <i>MEN1</i>)	50
5.3.2	Cromossomo 17 (Gene <i>PRKAR1A</i>)	51
5.4	Estudo de Expressão dos genes do <i>LHCGR</i> e <i>GIPR</i>	51
5.4.1	Experimentos de Padronização de Curvas	51
5.4.2	Gene <i>LHCGR</i>	60
5.4.2	Gene <i>GIPR</i>	62
5.5	Imunohistoquímica para o GIPR	64
6.	DISCUSSÃO	66
7.	CONCLUSÕES.....	78
8.	ANEXOS.....	81
9.	REFERÊNCIAS	95

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina para base nitrogenada e Alanina para aminoácido
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AIMAH	Hiperplasia adrenal macronodular independente de ACTH
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
Arg	Arginina
ATR1	Receptor tipo 1 de angiotensina 2
BAC	Células adrenocorticais bovinas
C	Citosina para base nitrogenada e cisteína para aminoácido
°C	Graus Celsius
cDNA	DNA complementar
CGH	hibridação genômica comparativa
CREB	Proteína ligadora de elemento responsivo à AMPc
CT	<i>Cycle threshold</i>
Δ CT	Delta CT
D	Ácido aspártico
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHEAS	Sulfato de dehidroepiandrosterona
dNTP	Desoxinucleotídeo
F	Fenilalanina
FGFR4	Receptor tipo 4 do fator de crescimento de fibroblasto
FSH	Hormônio foliculoestimulante

G	Guanina
GIP	Peptídeo insulíntrópico dependente de glicose
GIPR	Receptor do peptídeo insulíntrópico dependente de glicose
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
Gsα	Subunidade α da proteína G estimulatória
GNAS1A	gene que codifica a Gsα
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
His	Histidina
H ₂ O	Água
5-HT ₄	Serotonina 4
IGF2	Fator de crescimento símile a insulina tipo 2
INS-1	Linagem celular de insulinoma
Kb	Quilobase
L	Litro
LH	Hormônio luteinizante
LHCGR	Receptor do hormônio luteinizante e da gonadotrofina coriônica
LOH	Perda de heterozigose
MC2R	Receptor de melanocortina tipo 2
MEN1	Neoplasia endócrina múltipla tipo 1
MGB	<i>Minor groove Binder</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar

NCI H295R	Linhagem celular de carcinoma adrenal
nm	Nanômetros
ng	Nanogramo
p	Braço curto do cromossomo
<i>p53</i>	Gene supressor tumoral p53
pb	Pares de bases
P53	Proteína supressora tumoral P53
<i>p57/Kip2</i>	Gene codificador do supressor tumoral p57
PCR	Reação de polimerização em cadeia
<i>PDE11A</i>	Gene codificador da fosfodiesterase 11A4
PKA	Proteína kinase A
pmol	Picomol
PPNAD	Doença adrenocortical nodular pigmentosa primária
<i>PRKAR1A</i>	Gene que codifica a subunidade 1 α da proteína kinase A
PTH	Paratohormônio
q	Braço longo do cromossomo
R	Arginina
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
RT	Transcrição reversa
RT-PCR	Reação de polimerização em cadeia com transcrição reversa
S	Serina
SF1	Fator esteroideogênico 1
SGNEA1	Proteína neuroendócrina 1

T	Timina
TSH	Hormônio tireotrófico
U	Unidade
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μg	Microgramo
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
W	Triptofano
WISP2	<i>WNT1- inducible signaling pathway protein 2</i>
WNT-1	<i>Wingless-related mouse mammary tumor virus integration site 1</i>
X	Códon de parada
Y	Tirosina

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Critérios de Weiss.....	82
TABELA 2. Estadiamento dos tumores adrenocorticais	83
TABELA 3. Dados clínicos, histopatológicos, de expressão para o GIPR e LHCGR e de imunohistoquímica para o GIPR em 25 crianças com tumores adrenocorticais	84
TABELA 4. Dados clínicos, histopatológicos, níveis de expressão do <i>GIPR</i> e do <i>LHCGR</i> e imunohistoquímica para o GIPR em 30 pacientes adultos com tumores adrenocorticais	86
TABELA 5. Dados clínicos e moleculares dos pacientes com hiperplasia adrenocortical primária	88
TABELA 6. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo do gene <i>MEN1</i>	90
TABELA 7. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo do gene <i>PRKAR1A</i>	91
TABELA 8. Localização dos microssatélites e seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação do DNA genômico dos pacientes com <i>MEN1</i>	92
TABELA 9. Distribuição dos alelos dos microssatélites utilizados no estudo de LOH nos pacientes com <i>MEN1</i>	93
TABELA 10. Distribuição dos alelos do marcador intragênico utilizado no estudo de LOH no paciente com PPNAD	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regulação da esteroidogênese pelos receptores aberrantes.	17
Figura 2. Análise de LOH: análise comparativa entre a amplificação de dois alelos presentes no DNA de sangue periférico (painel superior) e em DNA de origem tumoral pancreático (painel inferior).	38
Figura 3. Produtos de RT-PCR submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3%. Análise dos fragmentos amplificados dos genes do <i>LHCGR</i> , <i>GIPR</i> e <i>β-actina</i> co-amplificada como controle interno. Os marcadores de peso molecular utilizados foram o 1kb DNA <i>ladder</i> e o Φ X 174/ <i>Hae</i> III.....	41
Figura 4. Seqüenciamento automático da região flanqueadora do exon 4 do gene <i>MEN1</i> que contém a mutação 893 +1 G> A, detectada na paciente 57.....	47
Figura 5. Seqüenciamento automático da região do exon 3 do gene <i>MEN1</i> que contém a mutação W183X, detectada em heterozigose na paciente 58.....	48
Figura 6. Seqüenciamento automático da região do exon 2 do <i>MEN1</i> que contém a mutação A68fsX118 detectada no paciente 59.....	49
Figura 7. Seqüenciamento automático da região do exon 2 do gene <i>PRKAR1A</i> no paciente 67.....	50
Figura 8. Curva de amplificação do <i>LHCGR</i> por PCR em tempo real	52
Figura 9. Curva de amplificação do <i>GIPR</i> por PCR em tempo real.....	52
Figura 10. Curva de amplificação da <i>β-actina</i> por PCR em tempo real.....	52
Figura 11. Curva padrão para o gene do <i>LHCGR</i> , obtida a partir de reações em multiplex	54

Figura 12. Curva padrão para o gene da β -actina, obtida a partir de reações em multiplex	54
Figura 13. Curva de eficiência LHCGR/ β -actina, obtida a partir de reações em multiplex	55
Figura 14. Curva padrão para o gene do <i>LHCGR</i> , obtida a partir de reações em <i>singleplex</i>	55
Figura 15. Curva padrão para o gene da β -actina, obtida a partir de reações em singleplex	56
Figura 16. Curva de eficiência <i>LHCGR</i> / β -actina obtida a partir de reações em <i>singleplex</i>	56
Figura 17. Curva padrão para o gene do <i>GIPR</i> , obtida a partir de reações em <i>multiplex</i>	57
Figura 18. Curva padrão para o gene da β -actina obtida a partir de reações em <i>multiplex</i>	57
Figura 19. Curva de eficiência <i>GIPR</i> / β -actina obtida a partir de reações em <i>multiplex</i>	58
Figura 20. Curva padrão para o gene do <i>GIPR</i> obtida a partir de reações em <i>singleplex</i>	58
Figura 21. Curva padrão para o gene da β -actina obtida a partir de reações em <i>singleplex</i>	59
Figura 22. Curva de eficiência <i>GIPR</i> / β -actina obtida a partir de reações em <i>singleplex</i>	59
Figura 23. Expressão do <i>LHCGR</i> em 55 tumores: 37 benignos e 18 malignos em comparação a 8 adrenais normais.	61

Figura 24. Expressão do <i>LHCGR</i> em 12 hiperplasias adrenais (7 AIMAH; 4 MEN1; 1 PPNAD) comparado a 8 adrenais normais (N)	61
Figura 25. Expressão do <i>GIPR</i> em 55 tumores: 37 benignos e 18 malignos em comparação a 8 adrenais normais.	63
Figura 26. Expressão do <i>GIPR</i> em 12 hiperplasias adrenais (7 AIMAH; 4 MEN1; 1 PPNAD) comparado a 8 adrenais normais (N)	63
Figura 27. Imunohistoquímica de tumores adrenocorticais (adenomas) com anticorpo policlonal para o GIPR.	65
Figura 28. Imunohistoquímica de tumores adrenocorticais (carcinomas) com anticorpo policlonal para o GIPR.	65

RESUMO

RESUMO

Costa MHS. *Estudo da expressão dos receptores do peptídeo insulínico dependente de glicose (GIPR) e do hormônio luteinizante (LHCGR) em tumores e hiperplasias do córtex adrenal* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 122p.

Introdução: Os receptores do peptídeo insulínico dependente de glicose (GIPR) e do hormônio luteinizante (LHCGR) são receptores acoplados à proteína G com amplo padrão de expressão tecidual. A expressão anômala destes receptores tem sido descrita em casos de hiperplasia adrenal macronodular independente de ACTH (AIMAH) e em alguns adenomas, resultando em aumento da secreção hormonal (cortisol, andrógenos e aldosterona) pelo córtex adrenal. O papel destes receptores em outras formas de hiperplasia, como a doença adrenocortical nodular pigmentosa primária (PPNAD), aumento da adrenal associado à neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (MEN1), e em carcinoma do córtex adrenal tem sido pouco investigado; sendo assim, considera-se relevante estudar a expressão destes receptores nos pacientes com tumores adrenocorticais esporádicos, nos pacientes com AIMAH, PPNAD e aumento adrenal associado à MEN1. **Objetivos:** 1) Caracterização molecular dos casos de neoplasia endócrina múltipla tipo 1 e PPNAD: pesquisa de mutações dos genes *MEN1* e *PRKAR1A* e análise da perda de heterozigose (LOH) destes genes no tecido adrenal destes pacientes. 2) Quantificar a expressão do GIPR e do LHCGR em tecido adrenocortical normal, tumoral, hiperplásico e correlacionar a expressão destes com a classificação histológica dos tumores adrenocorticais. **Pacientes:** 55 pacientes (30 adultos) com tumores adrenocorticais (37 adenomas e 18 carcinomas); 7 pacientes com AIMAH, 4 com MEN1, 1 com PPNAD e tecidos controles (adrenal; testículo e pâncreas). **Métodos:** extração de DNA genômico, RNA e síntese de DNA complementar (cDNA); amplificação por PCR das regiões codificadoras dos genes *MEN1* e *PRKAR1A* seguida por seqüenciamento automático. Pesquisa de LOH pela amplificação de microssatélites por PCR e análise pelo programa GeneScan. Quantificação da expressão do GIPR e do LHCGR por PCR em tempo real pelo método TaqMan e estudo de imunohistoquímica para GIPR nos tumores adrenocorticais. **Resultados:** identificação de 3 mutações (893+ 1G>A, W183X e A68fsX118) e dois polimorfismos (S145S e D418D) no gene *MEN1* e uma mutação (Y21X) no *PRKAR1A*. Ausência de LOH nos tecidos adrenais estudados. A expressão do GIPR e do LHCGR foi identificada em tecidos adrenais normais, tumorais e hiperplásicos. O nível de expressão do GIPR foi mais elevado nos tumores adrenocorticais malignos que nos benignos tanto no grupo pediátrico (mediana= 18,1 e 4,6, respectivamente; $p < 0,05$), quanto no grupo adulto (mediana = 4,8 e 1,3 respectivamente; $p < 0,001$). O nível de expressão do LHCGR, no grupo pediátrico, foi elevado tanto nos tumores benignos quanto nos malignos (mediana= 6,4 e 4,3, respectivamente). No grupo adulto os níveis de expressão deste receptor foram extremamente baixos nos tumores malignos em relação aos benignos (mediana= 0,06 e 2,3, respectivamente;

p <0,001). A imunohistoquímica para o GIPR foi variável e não correlacionada à expressão do gene *GIPR*. Não houve diferença nos níveis de expressão do *GIPR* e do *LHCGR* nas hiperplasias do córtex adrenal. **Conclusões:** a presença de LOH e mutação em heterozigose composta do gene *MEN1* e do *PRKAR1A* foram afastadas como mecanismos responsáveis pelo aumento adrenal tanto nos pacientes com MEN1 como no paciente com PPNAD. A hiperexpressão de *GIPR* está associada a malignidade nos tumores adrenocorticais nos grupos adulto e pediátrico e a baixa expressão de *LHCGR* está associada a malignidade nos tumores adrenocorticais somente no grupo adulto.

Descritores: Neoplasias do córtex supra-renal, neoplasia endócrina múltipla, hiperfunção adrenocortical, receptores de peptídeo, receptores do LH, polipeptídeo inibidor gástrico, expressão gênica, mutação gênica, perda de heterozigosidade, reação de polimerização em cadeia, imunohistoquímica.

SUMMARY

SUMMARY

Costa, MHS. *Expression Study of Glucose-dependent insulintropic peptide receptor (GIPR) and luteinizing hormone receptor (LHCGR) in adrenocortical tumors and hyperplasia* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 122p.

Introduction: The glucose- dependent insulintropic peptide receptor (*GIPR*) and luteinizing hormone receptor (*LHCGR*) are G-protein coupled receptors with a wide tissue expression pattern. The aberrant expression of these receptors has been described in cases of ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH) and in some adenomas, resulting in the increase of adrenal cortex hormonal secretion (cortisol, androgens and aldosterone). The role of these receptors in other forms of adrenocortical hyperplasia, such as primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD), adrenal enlargement associated with multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1), and adrenocortical carcinoma has been scarcely investigated. Thus, the study of the expression of these receptors in patients with sporadic adrenocortical tumors, AIMAH, PPNAD and adrenal enlargement associated to MEN1 was considered important. **Objectives:** 1) Molecular study in patients with multiple endocrine neoplasia type 1 and PPNAD: mutation screening of *MEN1* and *PRKAR1A* genes and analysis of the loss of heterozygosis (LOH) of these genes in the adrenal lesions of these patients. 2) To quantify the *GIPR* and *LHCGR* expression, in normal, tumor and hyperplasic tissue and to correlate the expression of these receptors with the adrenocortical tumor histology. **Patients:** 55 patients (30 adults) with adrenocortical tumors (37 adenomas and 18 carcinomas); 7 patients with AIMAH, 4 with MEN1, 1 with PPNAD and control tissue (adrenal, testis and pancreas). **Methods:** Extraction of genomic DNA, RNA and synthesis of complementary DNA (cDNA); PCR-amplification of the coding regions of *MEN1* and *PRKAR1A*, followed by direct sequencing. LOH study using polymorphic marker amplification by PCR and GeneScan software analysis. Quantification of *GIPR* and *LHCGR* expression using real-time PCR -TaqMan method and *GIPR* immunohistochemistry study in adrenocortical tumors. **Results:** Identification of 3 mutations (893+ 1G>A, W183X and A68fsX118) and two polymorphic alterations (S145S and D418D) in *MEN1* and a mutation (Y21X) in the *PRKAR1A* gene; LOH was not identified in adrenal tissue. The *GIPR* and *LHCGR* expression was identified in normal, tumor and hyperplasic adrenal tissues; the *GIPR* expression level was more elevated in malignant tumors compared to benign tumors in pediatric (median = 18.1 and 4.6, respectively; $p < 0.05$) and adult patients (median = 4.8 and 1.3 respectively; $p < 0.001$). The *LHCGR* expression in pediatric patients was elevated in benign as well as in malignant tumors (median = 6.4 and 4.3, respectively). In the adult group, the expression level of these receptors was extremely low in malignant tumors in relation to benign ones (median = 0.06 and 2.3, respectively; $p < 0.001$). The *GIPR* immunohistochemistry was variable and did not correlate with *GIPR*

gene expression. No difference between *GIPR* and *LHCGR* expression levels was observed in the different forms of hyperplasia. **Conclusions:** The presence of LOH and mutations in compound heterozygosis of *MEN1* and *PRKAR1A* genes were ruled out as the mechanisms responsible for the adrenal enlargement in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *GIPR* overexpression is associated with malignant adrenocortical tumors in the adult and pediatric patients and low *LHCGR* expression is associated with malignant adrenocortical tumors only in the adult patients.

Descriptors: Adrenal cortex neoplasms, multiple endocrine neoplasia, adrenocortical hyperfunction, peptide receptors, LH receptor; gastric inhibitory polypeptide, gene expression, genetic mutation, loss of heterozygosity, polymerase chain reaction, immunohistochemistry.

1. INTRODUÇÃO

Desde 1932, quando Harvey Cushing ¹ descreveu pela primeira vez a constelação de sinais e sintomas originários de um adenoma hipofisário, levando à hiperplasia difusa da glândula supra-renal, o conhecimento sobre a síndrome de Cushing evoluiu consideravelmente ². Atualmente, classifica-se a síndrome de Cushing endógena em hipercortisolismo dependente e independente de ACTH ³. A produção excessiva de ACTH por um microadenoma hipofisário, levando à hiperplasia difusa do córtex adrenal, é a forma mais comum da síndrome de Cushing dependente de ACTH (80%) ². A forma independente de ACTH compreende 20% dos casos e destes, 85-90% correspondem aos tumores adrenocorticais e 10-15% às formas de hiperplasia bilateral da adrenal, tais como: doença adrenocortical nodular pigmentosa primária e hiperplasia macronodular primária ^{4,5}.

Na última década, a síndrome de Cushing tem sido relacionada à expressão anômala de receptores de membrana nas células adrenocorticais, principalmente dos receptores acoplados à proteína G ⁴. A expressão destes receptores foi observada principalmente nos casos de síndrome de Cushing devido à hiperplasia macronodular e em raros casos de adenomas do córtex adrenal; entretanto, o significado fisiopatológico deste achado não foi elucidado ⁵.

1.1 Tumores Adrenocorticais

Tumores adrenocorticais têm sido diagnosticados mais freqüentemente na última década, com descrição de achado em 3-7% das autópsias ou durante exames de imagem, sendo considerados incidentalomas nesta última condição. Aproximadamente 95% destes tumores são benignos e cerca de 5% correspondem aos tumores malignos ⁶⁻⁸.

O carcinoma do córtex adrenal é uma doença rara correspondendo a menos de 0,05% de todas as neoplasias malignas. Nos EUA, a incidência destes tumores é de dois casos novos por milhão por ano ⁹. Nas regiões sul e sudeste do Brasil, uma incidência maior (10-15 vezes) dos tumores adrenocorticais tem sido verificada na população pediátrica ^{10, 11}. O estudo de toda região codificadora do gene *p53* foi realizado em 36 crianças com tumores adrenocorticais com o objetivo de determinar uma causa genética para a elevada incidência destes tumores na população do sul do Brasil e uma única mutação no gene supressor tumoral *p53* (Arg337His) foi identificada nesta população ¹². Em um outro estudo envolvendo 71 pacientes portadores de tumores adrenocorticais, esta mesma mutação foi detectada em 5 dos 41 (12%) adultos e em 24 das 30 (80%) crianças estudadas, confirmando a elevada incidência desta mutação em crianças brasileiras ¹³. Esta mutação não foi identificada em 160 indivíduos controles, indicando que esta não é uma alteração difundida na população brasileira e sugerindo sua implicação no desenvolvimento da tumorigênese adrenal. A

mutação Arg337His foi transmitida por pelo menos um dos pais em 10 das 14 famílias estudadas e a presença de um ancestral comum (efeito fundador) para esta mutação foi demonstrada nesta população ¹³.

As neoplasias adrenocorticais podem acometer qualquer faixa etária, mas apresentam uma incidência de distribuição bimodal com um pico antes dos cinco anos e outro na quarta e quinta décadas de vida ⁹. Em todas as séries publicadas há nítido predomínio do sexo feminino, variando entre 65 e 90% dos casos descritos ¹⁴.

Os tumores adrenocorticais geralmente secretam glicocorticóide e andrógenos, raramente produzem aldosterona e estrogênio ^{9, 15}. A síndrome de Cushing em associação ou não com a síndrome virilizante é a apresentação clínica mais comum nos adultos (60%). O restante dos tumores do córtex adrenal não são secretores, sendo diagnosticados como massas palpáveis ⁹. Na população pediátrica, a forma clínica mais freqüente (72%) de apresentação dos tumores adrenocorticais é a síndrome virilizante ¹⁵.

O diagnóstico tardio dos carcinomas adrenocorticais geralmente está associado a um prognóstico reservado com sobrevida de cinco anos em menos de 30% dos casos ^{6, 10, 16, 17}.

1.1.1 Critérios Histopatológicos para Classificação das Neoplasias

Adrenocorticais

Os critérios histológicos das neoplasias do córtex adrenal, bem como os indicadores de prognóstico, que diferenciam um tumor maligno de um benigno foram estabelecidos por diferentes autores. Os critérios mais conhecidos são os de Hough, Van Slooten e Weiss, sendo este último o mais usado (Tabela 1) ¹⁶⁻²⁰.

Um tumor é inequivocamente maligno somente quando existe invasão regional e/ou metástase à distância. Entretanto, nos estádios iniciais da doença não é possível distinguir tumores malignos dos benignos segundo este critério (Tabela 2). Os critérios histopatológicos de malignidade na população adulta são bem estabelecidos na literatura, embora os mesmos permanecem incertos na população pediátrica. Em um estudo com 83 pacientes pediátricos que apresentavam tumores do córtex adrenal, observou-se que fatores como peso e tamanho maiores que 400 g e 10,5 cm, respectivamente, invasão de veia cava, capsular e/ ou vascular, extensão para tecido adiposo peri-adrenal, necrose, severa atipia nuclear e presença de figuras de mitose estavam associados com malignidade ²¹. Existem relatos da literatura de comportamento benigno da doença em tumores considerados histologicamente malignos bem como o inverso, tumores com critérios de benignidade, que evoluíram com metástases à distância ²⁰⁻²². Estes relatos demonstram que os critérios histológicos utilizados para as neoplasias adrenocorticais nem sempre definem a evolução da doença, principalmente na população pediátrica ²⁰⁻²².

1.1.2 Alterações Moleculares nas Neoplasias Adrenocorticais

A possibilidade do envolvimento de uma herança genética relacionada ao aparecimento dos tumores adrenocorticais tem sido relatada a partir de casos entre irmãos e de familiares de pacientes com neoplasia adrenal ²². O estudo das alterações genéticas envolvidas em síndromes hereditárias, nas quais os tumores adrenocorticais estão presentes, tem proporcionado melhor esclarecimento no desenvolvimento da tumorigênese adrenal ²². A síndrome de Li-Fraumeni é uma doença autossômica dominante, que se caracteriza pelo desenvolvimento de múltiplos tumores como carcinoma de mama, tumores cerebrais, sarcomas de partes moles, leucemia e carcinoma adrenocortical ²³. Nesta síndrome ocorre mutação germinativa no gene *p53*, localizado no cromossomo 17p13.1, que somada à perda do alelo normal no tecido tumoral, leva ao desenvolvimento da doença ^{24, 25}. O *p53* é um gene supressor tumoral que age como fator de transcrição de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, diminuindo a replicação celular ou induzindo apoptose em células que sofreram dano no DNA, causado por agressores como vírus, radiação ou quimioterápicos ^{11, 12}. Mutações do *p53* têm alta prevalência em vários tumores humanos e uma única mutação (Arg337His) tem sido observada com grande frequência (78-97%), nos tumores adrenocorticais na população pediátrica das regiões sul e sudeste do Brasil ^{11, 12}. Esta mutação também foi identificada em adultos com tumores adrenocorticais em uma frequência menor (13%) e em parentes assintomáticos destes pacientes ¹¹. Através do seguimento dos pacientes que

carreiam a mutação Arg337His observou-se que a presença da mesma não está relacionada ao prognóstico desfavorável na maioria dos pacientes com tumores adrenocorticais ¹¹. Os tumores do córtex adrenal de pacientes com apresentação esporádica, portadores da mutação Arg337His do P53, freqüentemente (81%) apresentam perda de heterozigose (LOH), pela deleção do alelo normal do *p53* no cromossomo 17p13.1 ²⁶. Este achado não tem sido correlacionado com agressividade tumoral nestes pacientes ²⁶.

A síndrome de Beckwith-Wiedemann é uma doença de herança autossômica dominante que também pode ocorrer de forma esporádica. Os pacientes acometidos apresentam macroglossia, defeitos da parede abdominal, gigantismo, hepatoblastoma, rabdiomiosarcoma carcinoma adrenocortical e aumento do risco de tumor de Wilms ²⁷. As famílias afetadas apresentam uma duplicação da região cromossômica 11p15.5, onde se localizam os genes *IGF2*, *p57/KIP2*, e *H19* ^{22, 28}. Geralmente os genes autossômicos têm expressão bialélica; entretanto o gene *IGF2* sofre o fenômeno de *imprinting* funcional, que se caracteriza pela expressão monoalélica. A perda do *imprinting* do *IGF2* e a duplicação do alelo remanescente resultam em sua hiperexpressão, que tem sido descrita em várias neoplasias, incluindo tumor de Wilms, hepatoblastoma, carcinoma de cólon, de células renais e adrenocorticais ²². Nos tumores adrenocorticais malignos esporádicos, a hiperexpressão do gene do *IGF2* é encontrada freqüentemente ^{29, 30}.

As alterações genéticas identificadas em tumores adrenais esporádicos nem sempre apresentam correlação com a formação e

progressão tumoral ²². A maioria dos marcadores utilizados, como foi citado, foi obtida através de estudos em síndromes tumorais hereditárias. Gicquel e colaboradores ³¹ observaram uma correlação entre diagnóstico e prognóstico dos tumores adrenocorticais e alguns marcadores genéticos e moleculares. Noventa e seis pacientes diagnosticados com doença adrenal localizada foram seguidos por um período de 5 a 138 meses. A perda da heterozigose no cromossomo 17p13 (*locus* do *p53*) foi observada em 30% dos tumores restritos à glândula adrenal e em 85% dos carcinomas adrenocorticais. De forma semelhante, a LOH do 11p15 esteve presente em 34% das neoplasias restritas e em 83% dos carcinomas. A hiperexpressão do gene *IGF2* foi evidenciada em 28% dos tumores restritos à glândula adrenal e em 83% dos carcinomas ³¹. Recentemente em uma coorte de 24 tumores pediátricos (18 carcinomas, 5 adenomas e 1 tumor com classificação indeterminada) e sete adrenais normais observou-se um aumento de expressão do *IGF2* e do *FGFR4* nas amostras tumorais em relação ao tecido adrenal normal, com uma diminuição (6-8 vezes) dos genes do complexo de histocompatibilidade classe II nos casos de carcinoma adrenal ³².

Utilizando a técnica de hibridação genômica comparativa (CGH) e análise de microssatélites, observou-se alta frequência de perdas ou ganhos de regiões cromossômicas do DNA tumoral nos tumores do córtex adrenal ^{14, 22}. Perdas envolvendo os cromossomos 2, 11q e 17p, bem como ganho dos cromossomos 4 e 5 foram descritas em carcinoma adrenal ³³. Utilizando a mesma metodologia, foi observado em 8 de 9 tumores adrenocorticais isolados, de crianças brasileiras, ganho de material

cromossômico (região 9q34)³⁴. Recentemente utilizando a metodologia de FISH, Figueiredo e colaboradores³⁵ evidenciaram o aumento do número de cópias do gene *SF-1* (região 9q33.3). O SF-1 pertence à família dos receptores nucleares, apresentando papel importante na regulação das enzimas esteroidogênicas e na transcrição de genes envolvidos na determinação e diferenciação sexual e no desenvolvimento e função do córtex adrenal³⁵. Pinto e colaboradores¹³, observaram uma forte associação entre a perda dos cromossomos 2, 9, 11 e 17 e malignidade, sugerindo que a instabilidade cromossômica envolvendo 3 ou mais cromossomos possa ser utilizada como fator preditivo de malignidade nos tumores adrenocorticais.

Alterações nos receptores de membrana acoplados à proteína G (GPCR), também têm sido estudadas nos tumores adrenocorticais como marcadores moleculares de prognóstico. Os principais hormônios reguladores da produção hormonal adrenocortical são o ACTH e a angiotensina II. Mutações pontuais no gene do receptor do ACTH têm sido raramente descritas³⁶⁻³⁸; entretanto, deleções deste receptor têm sido identificadas em raros adenomas e carcinomas do córtex adrenal³⁹. Nenhuma mutação foi encontrada no gene do receptor tipo 1 da angiotensina 2 (*ATR1*) em tumores adrenais humanos, embora a hiperexpressão do mesmo tenha sido relatada em alguns casos⁴⁰⁻⁴². Alterações na expressão do gene do receptor do LHCG (*LHCGR*) também têm sido correlacionadas com a suscetibilidade para o desenvolvimento de tumores adrenocorticais em algumas linhagens de camundongos gonadectomizados^{43,44}. Em humanos, o papel deste receptor no

desenvolvimento de tumores adrenocorticais não está estabelecido ^{45, 46}. Mazzuco e colaboradores ⁴⁷ demonstraram que a expressão anômala de GPCR está associada ao desenvolvimento de tecido adrenocortical hiperplásico em camundongos adrenalectomizados transplantados com células adrenais geneticamente modificadas.

Estes achados, embora significativos, sugerem que estas alterações genéticas e moleculares não podem ser consideradas de forma inequívoca como marcadores preditivos do comportamento maligno dos tumores adrenocorticais. A patogênese molecular destes tumores envolve múltiplos fatores, que contribuem para a tumorigênese adrenal. A pesquisa de outros fatores associados à formação tumoral, bem como à esteroidogênese adrenal, podem contribuir para o esclarecimento do mecanismo molecular envolvido nas neoplasias adrenocorticais ^{14, 22, 30}.

1.2 Hiperplasia Macronodular Primária

A hiperplasia macronodular primária foi descrita inicialmente por Kirschner ⁴⁸ em 1964 e tem recebido várias denominações, como: hiperplasia macronodular autônoma, doença adrenocortical macronodular massiva, hiperplasia adrenal macronodular independente de ACTH (AIMAH) ou hiperplasia macronodular primária ⁴⁹. Esta doença tem maior incidência a partir da quinta década de vida, com proporção semelhante entre os sexos.

A apresentação clínica é geralmente esporádica, existindo também relatos de casos familiares ⁵⁰⁻⁵³. A maioria dos pacientes apresenta evidência de secreção anormal de cortisol aos testes dinâmicos com algum sinal ou sintoma de síndrome de Cushing, que pode se manifestar de forma atípica, periódica ou subclínica ⁵⁴.

Os tecidos adrenais com hiperplasia macronodular expressam o gene do receptor de ACTH (*MC2R*) e respondem com incremento do nível de cortisol ao estímulo com ACTH ^{55, 56}. Outra característica desta síndrome é a evolução benigna da doença, não havendo relatos na literatura sobre a presença de malignização a longo prazo ⁵⁴. A histologia da AIMAH é distinta, apresentando dois tipos celulares predominantes: células com citoplasma claro, rico em lipídios e células com citoplasma compacto, pobre em lipídios ^{57, 58}. O diagnóstico da AIMAH baseia-se nas imagens adrenais sugestivas pela tomografia computadorizada, que se caracterizam por grandes massas bilaterais hipodensas sem atenuação após contraste. A ressonância nuclear magnética identifica lesões com hipossinal em T1 e isossinal ou leve hiperssinal em T2), e na cintilografia com iodo-colesterol a captação bilateral é um achado característico ^{54, 59}. A patogênese molecular da hiperplasia macronodular não está elucidada, sendo considerada heterogênea na sua origem ⁵⁴. Fragoso e colaboradores ⁶⁰ identificaram mutações no gene da proteína G em 3 de 5 pacientes com AIMAH e síndrome de Cushing sem nenhuma manifestação da tríade clássica da síndrome de McCune-Albright (puberdade precoce, fibrodisplasia óssea e manchas café com leite). Mutação (F278C) no *MC2R* foi descrita em uma paciente com hiperplasia adrenal

bilateral e síndrome de Cushing independente de ACTH. Produção intraadrenal de ACTH foi demonstrada por imunohistoquímica e hibridação *in situ* em um caso de AIMAH associada a SC e níveis séricos suprimidos deste hormônio ⁶¹; perdas cromossômicas da região 17q22-24 foram observadas em 73% dos pacientes com esta patologia ^{38, 62}.

Alguns trabalhos têm demonstrado que a regulação da secreção do cortisol pelas adrenais na AIMAH pode ser mediada pela expressão inapropriada, ilícita ou ectópica de receptores de membrana acoplados à proteína G, como o do peptídio insulínico dependente de glicose (GIPR), e do receptor β -adrenérgico ⁶³⁻⁶⁶. A secreção do cortisol também pode ser mediada pela atividade alterada de receptores eutópicos, tais como, o do LHCG, os da vasopressina e o da serotonina (5-HT4) ⁶⁷⁻⁶⁹. Recomenda-se que a pesquisa destes receptores, conforme testes padronizados ⁷⁰, seja realizada em todos os casos de hiperplasia macronodular, uma vez que a resposta anômala aos testes pode ser observada mesmo nos casos sub-clínicos da síndrome de Cushing ^{5, 71}. A identificação destes receptores em hiperplasias e tumores associados à hipersecreção hormonal permite que novas opções terapêuticas sejam utilizadas como alternativa à adrenalectomia. Algumas medicações capazes de inibir a produção hormonal através do antagonismo destes receptores têm sido testadas com sucesso, embora o efeito das mesmas na inibição seja temporário e a ação sobre o crescimento tumoral permaneça controverso ^{4, 67}. O esclarecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na expressão anormal destes receptores pode permitir que novas opções

terapêuticas sejam aventadas, diminuindo a secreção hormonal e o crescimento tumoral. Recentes progressos foram feitos com identificação de novos genes e vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento da AIMAH. Hiperexpressão do gene *SGNEA1*, que codifica a proteína 7B2, *WISP2* e outros relacionados à via de sinalização WNT-1- β -catenina foi observada em casos de AIMAH ⁷². A comparação do perfil de expressão entre hiperperplasias e tumores associados à expressão anômala de GIPR e hiperplasia dependente de ACTH permitiu a identificação de cerca de 723 genes com expressão diferencial entre estes dois grupos, incluindo 461 com seqüências e funções conhecidas, relacionadas ao metabolismo, ao sistema imune, e aos mecanismos de proliferação e adesão celular ⁷³.

1.3 Doença Adrenocortical Nodular Pigmentosa Primária

A doença adrenocortical nodular pigmentosa primária, anteriormente denominada hiperplasia micronodular, é uma forma de hiperplasia adrenal bilateral e está associada à síndrome de Cushing independente de ACTH. A síndrome de Cushing nesta forma de hiperplasia pode ocorrer de forma cíclica e freqüentemente está associada a uma resposta paradoxal ao teste de supressão com dexametasona (aumento igual ou maior a 50% dos níveis de cortisol livre urinário). Os pacientes apresentam adrenais de tamanho normal, ou discretamente aumentadas, porém, com pequenos nódulos

pigmentados^{49, 74}. A PPNAD pode ocorrer de forma isolada ou associada a uma síndrome neoplásica múltipla de herança autossômica dominante, denominada complexo de Carney. Esta patologia caracteriza-se principalmente por pigmentação cutânea e em mucosa (lentiginose), mixomas e hiperfunção endócrina^{75, 76}.

Mutações inativadoras do gene *PRKAR1A* (17q22-24) foram identificadas na maioria dos casos de PPNAD de forma isolada ou associada ao complexo de Carney^{77, 78}. O *PRKAR1A* codifica a subunidade 1- α regulatória da proteína kinase A (PKA), que tem papel importante na via de sinalização intracelular mediada pela adenosina monofosfato cíclico (AMPc)⁷⁹. O gene *PRKAR1A* é considerado supressor tumoral; entretanto, um segundo evento genético somático, de acordo com o modelo de Knudson⁸⁰, representado pela perda do alelo normal nos tecidos tumorais nem sempre é identificado nestes pacientes. Alguns autores sugerem que outros mecanismos, como haploinsuficiência ou um efeito dominante negativo da proteína mutante poderão estar envolvidos no desenvolvimento tumoral destes casos^{81, 82}. Nos casos de PPNAD sem mutação do gene *PRKAR1A*⁸³ sugeriu-se o envolvimento de um outro *locus* gênico (2p16) como indicado nos estudos iniciais de análise de *linkage* em famílias com complexo de Carney⁸⁴. Um amplo estudo do genoma de pacientes com hiperplasia adrenocortical com este perfil revelou o envolvimento das regiões cromossômicas 2q31-2q35 e recentemente mutações no *PDE11A*, gene que codifica a fosfodiesterase 11A4, foram descritas⁸⁵. As fosfodiesterases regulam o nível de nucleotídeos cíclicos e mutações no

PDE11A estão associadas à diminuição da expressão desta proteína com conseqüente aumento de AMPc e da fosforilação de CREB (proteína ligadora de elementos responsivo a AMPc).

1.4 Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1

A neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (MEN1) é uma síndrome autossômica dominante caracterizada principalmente por tumores nas glândulas paratireóides, pâncreas e adenohipófise ⁸⁶. Hiperplasia adrenal e tumores adrenocorticais têm sido descritos em 20-40% dos pacientes com MEN1 ^{87, 88}. Na maioria dos casos, o aumento das adrenais não está associado à hiperfunção, embora raros casos de síndrome de Cushing e hiperaldosteronismo primário tenham sido descritos ^{89, 90}. A associação entre lesões adrenais e a presença de tumores pancreáticos foi relatada em pacientes com esta síndrome ⁹¹.

O gene responsável pela neoplasia endócrina múltipla tipo 1, localiza-se no cromossomo 11q13 e codifica uma proteína denominada menin ⁹². Mutações no *MEN1* são encontradas em 60-95% dos casos familiares; cerca de 10% das mutações deste gene são mutações “de novo”, responsáveis pelos casos esporádicos desta síndrome ⁹³. Recentemente, mutações em um outro gene, o p27^{kip1}, foram associadas ao desenvolvimento da MEN1 ⁹⁴. Perda de heterozigose envolvendo o *locus* 11q13 tem sido demonstrada na

maioria dos tumores presentes nesta doença e este fato associado à presença de mutações inativadoras encontradas nos pacientes com esta síndrome confirmam o papel supressor tumoral do *MEN1* segundo o modelo proposto por Knudson^{80, 95, 96}. Evidência de LOH nas adrenais de pacientes com *MEN1* mutado não é um evento freqüente. Beckers e colaboradores⁸⁹ identificaram LOH para o *locus* 11q13 em um adenoma adrenal produtor de aldosterona, enquanto Skogseid e colaboradores⁹⁷ evidenciaram LOH somente em um carcinoma adrenal ao estudarem 6 pacientes com neoplasia endócrina múltipla tipo 1 e lesões adrenais (2 adenomas, 3 hiperplasias e 1 carcinoma adrenal). A ausência de LOH do 11q13 não exclui o envolvimento de outros genes tumorais próximos a esta região ou que mutações somáticas do *MEN1* possam estar envolvidas na inativação seqüencial do segundo alelo deste gene, passo importante para o desenvolvimento dos tumores associados à esta síndrome^{98, 99}.

1.5 Regulação Hormonal do Córtex Adrenal e Receptores

Anômalos

Os principais reguladores da produção hormonal adrenocortical são o ACTH e a angiotensina II. A estimulação anômala da esteroidogênese por receptores ectópicos segue as mesmas vias estabelecidas pelo receptor de ACTH, como ilustrado na Figura 1⁴.

Figura 1. Regulação da esteroidogênese pelos receptores aberrantes. Representação esquemática adaptada de Lacroix e colaboradores ⁴ em que o ACTH liga-se ao receptor acoplado a proteína Gs, ativa a adenilciclase e produz AMPc. A proteína quinase A (PKA) ativada via AMPc, fosforila vários fatores de transcrição que regulam a síntese do cortisol. Os receptores aberrantes provavelmente utilizam a mesma via de ativação intracelular utilizada pelo receptor de ACTH.

O conceito de expressão anômala de receptores de membrana nas células do córtex adrenal foi proposto inicialmente por Robert Ney e colaboradores ¹⁰⁰ ao observarem que em carcinoma adrenal em ratos a adrenalina, noradrenalina, TSH, FSH, LH, prostaglandina E1 e ACTH estimularam a adenilciclase ^{100, 101}. Entretanto, a resposta aberrante da adenilciclase a vários hormônios não é um fenômeno universal. Em outro estudo, utilizando células Y1 de tumor adrenocortical de camundongos, a adenilciclase foi estimulada pelo ACTH, mas não pela adrenalina, PTH, insulina, glucagon, TSH ou prostaglandina E1 ¹⁰². A presença de

receptores alfa-adrenérgicos estimulando a guanilciclase também foi demonstrada em carcinomas de ratos ^{103, 104}. Matsukura e colaboradores ⁵⁵ estudaram a atividade da adenilciclase em tecidos adrenais humanos provenientes de adenomas, adenocarcinomas e hiperplasia nodular primária e observaram resposta do tecido adrenal normal ao estímulo com ACTH e prostaglandina E1. A maioria dos adenomas respondeu à noradrenalina e à adrenalina e em alguns casos ao TSH, LH, ou angiotensina II. A resposta da adenilciclase ao estímulo hormonal não foi encontrada em nenhum carcinoma adrenal. Entretanto, Katz e colaboradores ¹⁰⁵ ao estudarem 6 carcinomas adrenais humanos com atividade esteroidogênica diversa e 3 adrenais normais demonstraram que a adenilciclase foi estimulada pelos agonistas beta-adrenérgicos em 4 tumores, mas não em tecido de córtex adrenal normal.

A primeira evidência *in vivo* da existência de receptores ectópicos no córtex adrenal surgiu em 1987 quando Hamet ¹⁰⁶ descreveu um caso de síndrome de Cushing pós-alimentar em uma paciente com adenoma adrenal. Em 1992, Lacroix e Reznik ^{63, 107} publicaram os primeiros casos em que o hipercortisolismo pós-alimentar foi diretamente relacionado ao hiperestímulo do peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP). Desde então, vários grupos têm demonstrado que a produção de cortisol na AIMAH e em adenomas unilaterais pode estar associada à presença de receptores acoplados à proteína G, expressos de forma anômala na glândula adrenal ⁴. Os principais receptores com expressão anômala já descritos são: receptor do GIP, do hormônio luteinizante (LH); da

vasopressina, da serotonina, da interleucina, da leptina, e receptores β -adrenérgicos ^{4,5}.

Algumas hipóteses têm sido aventadas para explicar o mecanismo responsável pela hiperexpressão destes receptores no córtex adrenal. À semelhança do que ocorre em adenomas de paratireóide, hiperaldosteronismo mediado por glicocorticóide e carcinoma papilífero de tireóide, rearranjos gênicos podem estar envolvidos ¹⁰⁸⁻¹¹¹. Outro mecanismo a ser considerado é a presença de mutações pontuais na região promotora dos genes destes receptores, acarretando hiperexpressão dos mesmos e estímulo constitutivo da esteroidogênese ⁴. Entretanto, até o momento, a pesquisa de mutações na região codificadora, e na promotora no gene do receptor do peptídeo insulínico dependente de glicose (*GIPR*), foi negativa ¹¹².

A hiperplasia macronodular está geralmente associada à presença simultânea de vários receptores aberrantes. Este fato favorece a hipótese de que a alteração responsável pela expressão anômala destes receptores possa ocorrer em algum dos elementos reguladores, entre eles, os fatores de transcrição; co-ativadores e/ou fatores repressores destes genes, uma vez que a análise da região 5' flanqueadora do *GIPR* humano não evidenciou nenhuma mutação ¹¹³.

1.6 Receptor do Peptídeo Insulinotrópico Dependente de Glicose (GIPR)

O GIP é um hormônio gastrointestinal liberado durante as refeições, cuja principal função consiste no estímulo da secreção de insulina pelas células β pancreáticas ¹¹⁴.

O gene humano do receptor do GIP foi clonado em 1995, localiza-se no cromossomo 19q13.2-13.3 e codifica uma proteína com 466 aminoácidos que apresenta alta identidade com a dos hamsters e camundongos ¹¹⁵. Várias isoformas têm sido descritas, embora apenas duas sejam funcionais: uma com 466 aminoácidos e outra com inserção de 27 aminoácidos na região carboxi-terminal ^{113, 116}. O GIPR é um receptor acoplado à proteína G que pertence à mesma família dos receptores do peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e do glucagon ¹¹⁵. O gene do *GIPR* tem expressão no endotélio, intestino, tecido adiposo, coração e no tecido cerebral ¹¹⁷⁻¹²². Pequenas quantidades do RNA mensageiro (RNAm) do *GIPR* foram também detectadas em adrenais humanas. No entanto como o córtex adrenal normal não responde ao estímulo pelo GIP com aumento da produção de cortisol, este RNAm pode refletir apenas contaminação com células endoteliais ^{63, 118, 119}.

Mais de 25 casos de síndrome de Cushing dependente do GIP (18 hiperplasias macronodulares e 7 adenomas) foram descritos até o momento; entretanto este receptor não foi identificado em nenhum caso de carcinoma adrenal ^{63, 106, 107, 118-120, 122-126}. Resposta anormal do córtex adrenal ao GIPR também foi associada à produção androgênica e a hirsutismo ¹²⁷.

1.7 Receptor do Hormônio Luteinizante (LHCGR)

O receptor do LHCG ao qual se ligam tanto o hormônio luteinizante como a gonadotrofina coriônica humana (hCG), desempenha um papel crucial no eixo reprodutivo em ambos os sexos ¹²⁸. O gene do *LHCGR* localiza-se no cromossomo 2p21 ¹²⁸. A expressão deste receptor tem sido descrita em vários tecidos extra-gonadais, incluindo o córtex adrenal normal, porém, sua função biológica nestes tecidos não está definida ^{129, 130}.

A primeira descrição da expressão anômala do *LHCGR* em tecido adrenal foi feita em uma paciente com síndrome de Cushing devido a AIMAH ⁶⁷. Posteriormente, outros casos de AIMAH associados ao fenótipo de Cushing e/ou de virilização e hiperexpressão deste receptor foram descritos ¹³¹⁻¹³³. O primeiro caso de síndrome de Cushing devido à expressão anômala de *LHCGR* em carcinoma adrenocortical foi descrito por Wy e colaboradores ¹³⁴. A paciente apresentava síndrome de Cushing e a hiperexpressão do *LHCGR* foi identificada por hibridação *in situ*.

O receptor do LHCG tem sido implicado no desenvolvimento de tumores adrenocorticais em algumas linhagens de camundongos ^{43, 44}. Nestes animais, o aumento da expressão do *LHCGR* foi detectado em tumores adrenocorticais induzidos pós-gonadectomia ⁴³.

Existem na literatura vários relatos de tumores unilaterais secretores de andrógenos que respondem ao estímulo com gonadotropinas ¹³⁵⁻¹³⁹. Apesar disso, o papel da expressão do *LHCGR*

em tumores adrenocorticais em humanos não está definido. Em um estudo usando RT-PCR e *dot blot* em tumores de diferentes graus de agressividade, Barbosa e colaboradores ⁴⁵ sugerem que a baixa expressão deste receptor pode estar relacionada a um comportamento mais agressivo em alguns tumores adrenocorticais. Contudo, dos estudos realizados para determinar a expressão anômala de receptores no córtex das neoplasias adrenais, nenhum deles comparou os níveis de expressão dos receptores do LHCG e do GIP em adenomas, carcinomas e em hiperplasia macronodular e micronodular. Os estudos desenvolvidos até o momento também não verificaram se há diferenças de expressão destes receptores entre os tumores adrenocorticais esporádicos nas populações adulta e pediátrica, uma vez que a apresentação clínica dos tumores adrenocorticais, bem como, sua evolução e prognóstico são distintos nestas populações ¹⁵.

Vários autores têm pesquisado possíveis marcadores de evolução e prognóstico na tumorigênese adrenal ^{6, 29, 31}. Não está estabelecido se a expressão anormal dos receptores acoplados à proteína G poderiam desempenhar algum papel na proliferação das células adrenais e se esta expressão poderia ser um marcador de proliferação lenta e benigna no processo da tumorigênese adrenal ^{4, 5}.

Estudos *in vitro* mostram que o *GIPR* pode estar relacionado tanto a fenômenos proliferativos como a uma resposta esteroidogênica eficaz ¹¹⁸. Desta forma, questionamos se o *GIPR* poderia estar envolvido no aumento da adrenal nos casos de hiperplasia glandular associados a MEN1.

Sendo assim, consideramos relevante comparar a expressão dos genes dos receptores do GIP e do LHCG nos pacientes com tumores adrenocorticais esporádicos na faixa etária adulta e pediátrica, nos pacientes com aumento da glândula adrenal associado à síndrome da neoplasia endócrina múltipla tipo 1, e nos pacientes com hiperplasia adrenal macro e micronodular.

2. OBJETIVOS

- 1) Pesquisar a presença de mutações dos genes *MEN1* e *PRKAR1A* em pacientes com neoplasia endócrina múltipla tipo 1 e complexo de Carney, respectivamente.
- 2) Analisar a perda de heterozigose das regiões cromossômicas 11q12.1-11q14.1 (*MEN1*) e 17q 22-24 (*PRKAR1A*) no tecido adrenal de pacientes com neoplasia endócrina múltipla tipo 1 e complexo de Carney, respectivamente.
- 3) Quantificar a expressão dos genes dos receptores do GIP e do LHCG por PCR em tempo real em tecido adrenocortical normal, em tumores adrenocorticais e nas diferentes formas de hiperplasia adrenocortical: hiperplasia macronodular independente de ACTH; doença adrenocortical nodular pigmentosa primária; lesões adrenais associadas à MEN1.
- 4) Correlacionar a expressão dos genes dos receptores do GIP e do LHCG com a classificação histológica dos tumores adrenocorticais e a progressão da doença.

3. CASUÍSTICA

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para análise de projetos de pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo de pesquisa N° 783/03). Os pacientes, ou seus responsáveis legais, assinaram o protocolo de consentimento informado para este estudo molecular.

Foram selecionados 67 pacientes, 52 do sexo feminino e 15 do masculino com doença adrenocortical primária, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os dados clínicos e laboratoriais encontram-se nas tabelas 3-5. Cinquenta e cinco pacientes apresentavam tumor adrenocortical; sete tinham hiperplasia macronodular, quatro apresentavam aumento da adrenal associado a MEN1 e um apresentava PPNAD associada ao complexo de Carney. Entre os 55 pacientes com tumor adrenocortical, 30 eram adultos com idade média de $37,9 \pm 11,3$ (22 a 66 anos) e 25 eram pediátricos com idade média de $12,8 \pm 6,3$ (0,9 a 18 anos).

Quarenta e oito dos 55 tumores adrenocorticais (87,2%) foram classificados como funcionantes, devido à sua produção hormonal autônoma e sete como não funcionantes (12,8%). No grupo adulto, 14 pacientes apresentavam síndrome de Cushing, cinco tinham um quadro misto de Cushing e virilização e quatro apresentaram somente virilização.

No grupo pediátrico, 15 pacientes apresentaram virilização, oito apresentaram quadro clínico misto (virilização associada à síndrome de Cushing; um paciente apresentou feminização associada a Cushing) e dois indivíduos apresentaram síndrome de Cushing isolada.

Utilizamos os critérios histopatológicos definidos por Weiss¹⁶ (Tabela 1), bem como a classificação proposta por Sullivan¹⁴⁰ (estádios de I a IV) adaptados de Macfarlane¹⁴¹ (Tabela 2) para estabelecer a definição de malignidade dos tumores adrenocorticais. Consideramos critério de malignidade, ao diagnóstico inicial, o achado de Macfarlane ≥ 3 no grupo pediátrico e o score de Weiss ≥ 4 no grupo adulto ou a evolução com metástase ou óbito pela doença neoplásica em ambos os grupos. Dos 55 pacientes com tumores adrenocorticais, 18 (30%) apresentavam tumores malignos (10 do grupo adulto e 8 do grupo pediátrico). No grupo pediátrico, observamos que 5 de 17 (30%) pacientes tinham Weiss ≥ 4 e evolução benigna, confirmando que este critério isoladamente não é preditivo para definir malignidade dos tumores adrenocorticais nesta população¹⁵.

A avaliação hormonal pré-operatória dos pacientes com tumores adrenocorticais incluiu dosagens de: LH, FSH, estradiol, testosterona, ACTH, DHEA, DHEAS, androstenediona, desoxicortisol, aldosterona, renina, cortisol urinário, cortisol basal e após 1 e 8 mg pós-dexametasona. Dos sete pacientes com síndrome de Cushing devido a AIMAH, seis foram submetidos aos testes para pesquisa de receptores aberrantes de acordo com o protocolo desenvolvido por Lacroix e colaboradores⁷⁰. Os pacientes 64 e 66 (Tabela 5) são casos familiares e apresentaram resposta anormal ao

teste da metoclopramida, sugerindo a presença ilícita do receptor 5HT4 da serotonina em tecido adrenal.

Pesquisa de mutação do gene *GNAS1A* que codifica a proteína $Gs\alpha$ foi previamente realizada nos pacientes 60 e 62 (Tabela 5). A mutação R201S foi descrita somente na paciente 60⁶⁰.

Foram incluídas no estudo, como controles, oito adrenais normais de pacientes com tumor renal, cujo tecido fora obtido pós-consentimento informado a partir das nefrectomias realizadas pelo serviço de Urologia do HC-FMUSP. Foram também utilizados tecidos controle-positivos para a expressão de cada receptor estudado (testículo para o receptor do LHCG e pâncreas para o receptor do GIP), obtidos a partir de pacientes submetidos à ressecção cirúrgica destes órgãos por diferentes indicações.

4. MÉTODOS

4.1 Extração de DNA

4.1.1 Sangue periférico

As amostras de DNA genômico de todos os pacientes bem como dos indivíduos controles-normais foram obtidas a partir de sangue periférico pelo método de Muller modificado ¹⁴².

4.1.2. Tecidos

Os tecidos, obtidos durante cirurgia, foram coletados em microtubos, sob condições estéreis e imediatamente armazenados em nitrogênio líquido. Todos os pacientes com lesões adrenais foram submetidos à adrenalectomia (uni ou bilateral), exceto três pacientes (58, 64 e 65) (Tabela 5) que realizaram biópsias da glândula adrenal. As amostras tumorais foram obtidas a partir da região central do tumor para minimizar a possibilidade de contaminação por tecido normal. As áreas de necrose e hemorragia foram evitadas.

A extração do DNA genômico dos tecidos preservados em nitrogênio líquido foi realizada utilizando-se produtos comerciais para extração de DNA, QIAamp DNA *Mini Kit* (QUIAGEN, Hilden, Alemanha) e Wizard® Genomic DNA Purification *Kit* (Promega Madison, EUA).

Nos tecidos conservados em parafina foi utilizado um protocolo estabelecido no Laboratório de Hormônio e Genética Molecular LIM/42 através da adaptação do protocolo de Rupp e colaboradores^{13, 143}.

4.2 Extração de RNA

O RNA total das amostras foi extraído a partir dos tecidos congelados em nitrogênio líquido utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) conforme recomendação descrita no produto comercial. A integridade do RNA extraído foi testada após eletroforese em gel de agarose a 1%, para avaliação das bandas de RNA ribossômico. As concentrações das amostras de RNA total foram avaliadas a partir da leitura em espectrofotômetro e determinada por absorbância a 260 nm. Foram utilizadas apenas as amostras com uma relação (estabelecida a partir dos valores obtidos nas absorbâncias 260 e 280 nm) acima de 1,8.

4.3 Síntese do DNA Complementar

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por transcrição reversa a partir de 5 µg de RNA total de cada amostra em um volume final de reação de 50 µL utilizando a enzima *multiscribe* e oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) randômicos segundo protocolo descrito no produto comercial *High- capacity cDNA Archive kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

4.4 Reação de Polimerização em Cadeia

A reação de polimerização em cadeia (PCR) foi utilizada para amplificação:

- da região codificadora do gene *MEN1* a partir de DNA genômico de sangue periférico, de DNA genômico e cDNA de tecidos tumorais dos quatro pacientes com neoplasia endócrina múltipla tipo 1.
- da região codificadora do gene *PRKAR1A* a partir de DNA genômico de sangue periférico e de tecido tumoral em um paciente com PPNAD.

- de microssatélites para análise da perda de heterozigose em tecidos tumorais (adrenal, pancreático ou hipofisário) dos 4 pacientes com MEN1 e em tecido adrenal do paciente com PPNAD.

As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados, a temperatura de hibridação e o tamanho do fragmento amplificado dos genes *MEN1* e *PRKAR1A* estão descritos nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. As reações de polimerização em cadeia foram realizadas a partir de DNA genômico (100-500 ng) ou cDNA (pacientes com MEN1), 200 µM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 10-30 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,5 -2,5 U de enzima *Taq* Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 5 µL de tampão para reação de PCR, MgCl₂ (1,5 mM) e H₂O MiliQ a completar para um volume final de 50 µL. O protocolo de amplificação consistiu de uma pré-desnaturação a 95 °C por 10 minutos, seguida de 35 a 40 ciclos a 94 °C por 45 segundos (desnaturação); temperatura de hibridação (de acordo com os oligonucleotídeos) por 45 segundos e 72 °C por 50 segundos (extensão); seguidos de um ciclo de extensão final de 72 °C por 7 minutos.

O marcador intragênico 5'(CA)_n foi utilizado no estudo de LOH para o *locus* do *PRKAR1A* (17q22-24) (Tabela 7). A localização dos microssatélites no braço longo do cromossomo 11, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados, a temperatura de hibridação e o tamanho dos fragmentos amplificados para os marcadores do cromossomo 11 encontram-se na tabela 8. Os oligonucleotídeos iniciadores *sense* utilizados na amplificação de microssatélites foram marcados por fluorescência (6-FAMTM) na extremidade 5'.

A reação de amplificação para os microssatélites caracterizou-se por um volume final de 15-50 μL contendo 20-100 ng de DNA genômico, 200 μM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 10-30 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5 U de enzima *Taq* DNA polimerase e 5 μL do tampão fornecido pelo fabricante (Amersham Pharmacia, Upsala, Suécia) para os microssatélites PYGM, D11S527 e para o marcador intragênico do *PRKAR1A*. Para os microssatélites D11S4191, D11S987 e D11S937 utilizou-se 0,5 U da enzima *Taq* Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 5 μL do tampão fornecido pelo fabricante e MgCl_2 (1,5mM). O protocolo de amplificação consistiu de uma pré-desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, com a temperatura de hibridação variando de acordo com os oligonucleotídeos iniciadores por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos; seguidos de um ciclo de extensão final a 72 °C por 30 minutos. Quando a enzima *Taq* Gold foi utilizada, o protocolo de PCR consistiu de 1 ciclo de pré-desnaturação a 95 °C por 10 minutos, 10 ciclos a 94 °C por 15 segundos, 55 °C por 15 segundos e 72 °C por 30 segundos, 20 ciclos de 89 °C por 15 segundos, 55 °C por 15 segundos e 72 °C por 30 segundos; seguidos por 1 ciclo de extensão de 72 °C por 7 minutos.

Os fragmentos amplificados para a pesquisa de mutações nos genes *MEN1* e *PRKAR1A* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% corados com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/mL}$) (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Os marcadores de peso molecular utilizados foram o ΦX 174/*Hae* III e o 1kb DNA ladder (Invitrogen, Life Technology, Gaithersburg, MD, EUA). As amostras foram visualizadas sob

transiluminação em luz ultravioleta e fotografadas com filme instantâneo preto e branco (Polaroid 667). Realizou-se separação de duas bandas visulizadas no gel de agarose, obtidas da amplificação dos exons 4 e 3 (gene *MEN1*) a partir de cDNA dos pacientes 57 e 58 (Tabela 5), respectivamente; Estas bandas foram purificadas segundo protocolo descrito no produto comercial *QIAEX II Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Valência, CA, EUA).

Para análise de microssatélites, 2 µL do produto de PCR, 24 µL de formamida Hi-DiTM (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e um 1 µL de marcador de peso molecular TAMRA 350 ou ROX 350 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) foram submetidos à eletroforese capilar em seqüenciador automático (ABI Prism 310) seguido de análise dos fragmentos pelo programa *GeneScan* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

4.5 Seqüenciamento Automático

Os produtos de PCR foram purificados através do tratamento enzimático com 2 µL de ExoSap-IT (Amersham Pharmacia Biotech, Cleveland, OH, EUA) para cada 5 µL de produto de PCR, por 15 minutos a 37 °C, seguido de 15 minutos a 80 °C. Após a purificação, estes produtos foram submetidos a uma reação de seqüenciamento utilizando-se o produto comercial, *ABI PrismTM Big Dye Terminator* (Applied Biosystems, Foster

City, CA, EUA). Os produtos obtidos foram novamente purificados em colunas Centri Sep (Princeton Separation, Adelphia, New Jersey, EUA), e as amostras foram submetidas à eletroforese capilar em um seqüenciador automático *ABI Prism Genetic Analyzer 3100* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.6 Determinação da Perda de Heterozigose (*MEN1* e *PRKAR1A*)

Para verificação de LOH envolvendo o gene *MEN1* foram utilizados 5 marcadores polimórficos (D11S937, D11S987, D11S4191, D11S527 e PYGM), em 4 pacientes com lesões adrenais associadas à neoplasia endócrina múltipla tipo 1.

No estudo de LOH envolvendo o gene *PRKAR1A* foi utilizado um marcador intragênico (5'CA)_n no tecido adrenal do paciente com PPNAD.

O produto de amplificação de cada alelo, analisado pelo programa *GeneScan*, foi visualizado graficamente como um pico de altura correspondente à intensidade de amplificação (fluorescência). Perda de heterozigose foi definida quando um dos alelos (picos) presentes no DNA do sangue periférico estava ausente no DNA de origem tumoral. Entretanto, a evidência de um padrão de amplificação menor, mas não ausente de um dos alelos, também foi indicativa de LOH. É possível

estabelecer uma razão entre o grau de amplificação dos alelos no tumor e o grau de amplificação dos alelos presentes no DNA de sangue periférico. Quando esta razão se mantém semelhante no tumor, não há perda de heterozigose (figura 2A). Por outro lado, uma razão <0.5 ou >2.0 (Figura 2B) é indicativa de LOH^{13, 26}.

Figura 2. Análise de LOH: análise comparativa entre a amplificação de dois alelos presentes no DNA de sangue periférico (painel superior) e em DNA de origem tumoral pancreático (painel inferior).

(A) ausência de perda de heterozigose, a razão entre a amplificação dos dois alelos em ambos os tecidos é mantida. (B) perda de heterozigose, a razão entre a amplificação dos dois alelos nos dois tecidos não se mantém.

4.7 Estudo da Expressão do *LHCGR* e *GIPR* por PCR em Tempo Real

As reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas pelo método TaqMan, utilizando-se ABI 7000 *Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para quantificação do gene *LHCGR* foi desenhada uma sonda MGB marcada com 6-FAM, juntamente com oligonucleotídeos seqüência-específicos: *sense*: 5'GCACAATGGAGCCTTCCGT3', *anti-sense*: 5'GGCCTGCAATTTGGTGGAA3'; sonda: 5'CCGAAAACCTTGGATATTT3'. Para quantificação do *GIPR* foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores e sonda comercialmente disponíveis (Assay ID Hs00609210_m1) (Assay on demand Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Como controle interno foi utilizado a β -actina (Assay ID 4326315E) (Assay on demand Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), cuja sonda MGB é marcada com corante fluorescente (fluorocromo VIC).

A quantificação relativa dos receptores do GIP e do LHCG foi realizada utilizando-se como calibrador um *pool* comercial de adrenais normais de 61 adultos (Human Adrenal Gland Total RNA, Clontech, Palo Alto, CA, EUA). Um *pool* comercial de adrenais fetais humanas (Clontech, Palo Alto, CA, EUA) também foi estudado.

O cálculo da quantificação, de forma a permitir uma comparação expressa em número de vezes, foi realizada utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ conforme descrito por Livak¹⁴⁴. ΔCT é diferença de expressão entre o gene

alvo e o endógeno de uma determinada amostra e o $\Delta\Delta CT$ corresponde à diferença entre o ΔCT de uma determinada amostra e o ΔCT do calibrador.

Para validar o $2^{-\Delta\Delta CT}$ como método de quantificação, foi padronizada, uma curva de diluição de forma a demonstrar que a eficiência de amplificação do gene alvo e do endógeno eram semelhantes. Para tanto, foram estabelecidas diluições progressivas 1:2 de amostras de cDNA (obtidas a partir de 300 a 9,375 ng de RNA total) com o intuito de observar uma diferença entre as diluições de um ciclo (CT). A curva padrão foi realizada com os genes alvos (*LHCGR* e *GIPR*) e o gene endógeno (β -*actina*) amplificados em um único tubo (*multiplex*) ou em tubos separados (*singleplex*). Cada ponto da reta foi estabelecido pela relação do log da quantidade do RNA total da amostra no eixo das abscissas e o CT da amostra no eixo das ordenadas. O experimento é validado por uma equação da reta em que a inclinação da mesma seja mais próximo de -3,3 com uma relação $r \geq 0,99$. Realizou-se experimentos para a curva de eficiência, em que cada ponto da reta é estabelecido pela relação do log da quantidade de RNA total da amostra no eixo das abscissas e o ΔCT da amostra em cada ponto de diluição. Um resultado satisfatório foi confirmado pela presença de uma inclinação da reta $\leq 0,1$, demonstrando uma eficiência de amplificação equivalente entre o gene alvo e o endógeno.

As reações foram preparadas em triplicata, em um volume final de 25 μL , contendo 12,5 μL de *Taqman Universal mastermix* 2x, 1,25 μL de cada *Assay* (*primers* e sonda) 20 x (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 1,5 μL de cDNA (obtido a partir de 150 ng de RNA total) e H₂O MiliQ a

completar. Como controle de qualidade das reações, o coeficiente de variação máximo permitido nas triplicatas foi de 2%, caso contrário os experimentos foram repetidos.

As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50 °C por 2 minutos, seguida pela ativação da *Taq* Gold a 95 °C por 10 minutos e 50 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos intercalados com hibridação e extensão a 60 °C por minuto. Para confirmação do tamanho dos fragmentos dos produtos amplificados na PCR em tempo real, eles foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3% corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Os marcadores de peso molecular utilizados foram o 1kb DNA *ladder* e o Φ X 174/*Hae* III (Invitrogen, Life Technology, Gaithersburg, MD, EUA). As amostras foram visualizadas sob transiluminação em luz ultravioleta e fotografadas com filme instantâneo preto e branco (Polaroid 667) (Figura 3).

Figura 3. Produtos de RT-PCR submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3%. Análise dos fragmentos amplificados dos genes do *LHCGR*, *GIPR* e β -actina co-amplificada como controle interno. Os marcadores de peso molecular utilizados foram o 1kb DNA *ladder* e o Φ X 174/*Hae* III

4.8 Imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi realizada nos tumores adrenocorticais a partir dos blocos de parafina; cortes histológicos de 4 μm foram feitos e colocados em lâminas de vidro previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxissilano. Em seguida foram aquecidos a 60 °C durante a noite, desparafinados com xilol e reidratados com concentrações decrescentes de etanol até água destilada.

A peroxidase endógena foi bloqueada em solução de peróxido de hidrogênio a 3% (10 volumes) com 10 imersões de 5 minutos cada. Para recuperação dos antígenos, os cortes foram imersos em tampão citrato (0,01 mol/L em pH 6,0), aquecidos em panela de pressão por 3 minutos e a seguir foram lavados em PBS; um anticorpo policlonal para o GIPR- OPA1- 15060 (Bioreagents, EUA) foi utilizado na diluição 1:40.

A reatividade foi detectada através de incubação com anticorpo secundário (específico para a espécie animal em que foi produzido o anticorpo primário), e um polímero peroxidase (Envision, Dako, EUA) empregando como cromógeno 3,3' diaminobenzidina. Após lavagem em água corrente, os cortes foram contracolorados em Hematoxilina e posteriormente lavados novamente, submetidos à desidratação com concentrações crescentes de etanol (75%, 95% 2 vezes, etanol absoluto 2 vezes), xilol 3 vezes e montados em entellan.

Cortes histológicos de tecido pancreático serviram como controles positivos para as reações do GIPR; cortes em que foram omitidos apenas os anticorpos primários serviram como controle negativo. A reação foi considerada positiva nas amostras com inequívoca coloração citoplasmática para o GIPR; definiu-se (-) a ausência de marcação para o GIPR, ++ e +++ para marcação menor e maior que 50% das células adrenais tumorais, respectivamente, e ++++ para marcação para o GIPR em 100% das células.

4.9. Análise Estatística

Os dados obtidos foram organizados e tabulados em planilhas do programa Excell em Windows XP (Microsoft Corporation, CA, EUA).

A seleção das medidas de tendência central e dispersão dos valores que compõem as amostras, assim como dos testes estatísticos para comparação entre elas, baseou-se nos tipos de distribuição. As distribuições foram definidas como paramétricas ou não paramétricas segundo o programa estatístico SigmaStat versão 2.0 (SPSS Inc, Illinois, EUA) pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Os dados referentes à distribuição por faixa etária são apresentados em média $\pm$ DP e intervalo. Os valores de expressão dos genes dos receptores do LH e GIP em todos os grupos são apresentados na forma de

mediana e intervalo e foram comparados pelos testes do Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. A correlação entre a expressão destes receptores nos pacientes com tumores adrenocorticais e o cortisol urinário, cortisol basal e após 1 e 8 mg de dexametasona, ACTH, LH, FSH, estradiol, testosterona, DHEA, DHEAS, androstenediona, desoxicortisol, aldosterona, renina, sódio e potássio foi feita pela correlação de Spearman. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5. RESULTADOS

5.1 Gene *MEN1*

Foram identificadas 3 mutações distintas, 893 + 1G > A, W183X e A68fsX118, no gene *MEN1*, detectadas nos pacientes 57, 58 e 59, respectivamente (Figuras 4 - 6). Na paciente 56, com neoplasia endócrina múltipla tipo 1, não foi identificada nenhuma mutação; exceto duas variantes alélicas, uma no exon 2 causada pela troca C>T no códon 145 (S145S) e outra no exon 9 pela troca C>T no códon 418 (D418D) ¹⁴⁵. O seqüenciamento da região codificadora do cDNA do gene *MEN1*, a partir de material obtido das lesões adrenais, foi realizado nos 4 pacientes (56-59, Tabela 5), para avaliar a presença ou não de uma segunda mutação como evento responsável pela tumorigênese adrenal nestes casos. Nenhuma outra mutação foi encontrada nas lesões adrenais destes casos. Nos pacientes 57 e 58, foi observado que a mutação 893 + 1G > A resultou em um *in-frame skipping* do exon 4 e a mutação W183X resulta na perda parcial do exon 3, respectivamente (Figuras 4 e 5). Nos pacientes 56 e 59 o seqüenciamento do cDNA do tecido adrenal apresentou o mesmo padrão observado no seqüenciamento do DNA genômico.

Figura 4. Seqüenciamento automático da região flangeadora do exon 4 do gene MEN1 que contém a mutação 893 +1 G> A, detectada na paciente 57. As setas indicam em (A) mutação em heterozigose caracterizada por uma substituição G>A na primeira base do intron 4, no sítio de *splice*; e em (B) seqüenciamento do cDNA que demonstra um *in-frame skipping* do exon 4.

Figura 5. Seqüenciamento automático da região do exon 3 do gene *MEN1* que contém a mutação W183X, detectada em heterozigose na paciente 58. As setas indicam em (A) mutação em heterozigose (substituição G>A) no exon 3 com troca de um triptofano na posição 183 por um códon de parada (B) esta mesma mutação no cDNA resulta na perda parcial do exon 3 no tecido adrenal da paciente.

Figura 6. Seqüenciamento automático da região do exon 2 do MEN1 que contém a mutação A68fsX118 detectada no paciente 59. As setas indicam em (A) a deleção de uma citosina em heterozigose que leva a um *frameshift* com alteração da leitura a partir do códon 68 (alalina) resultando em um códon de parada na posição 118 (A68fsX118) e em (B) seqüenciamento de um controle normal.

5.2 Gene *PRKAR1A*

No paciente 67 com PPNAD foi detectada uma nova mutação no exon 2 do gene *PRKAR1A* que leva a troca de uma tirosina por um códon de parada na posição 21 (Y21X).

Figura 7. Seqüenciamento automático da região do exon 2 do gene PRKAR1A no paciente 67. As setas indicam em (A) a mutação em heterozigose (substituição C>A) no exon 2 que resulta na troca de uma tirosina por um códon de parada na posição 21 (Y21X) e em (B) seqüenciamento de um controle normal.

5.3 Estudo de Microssatélites: Análise de LOH

5.3.1 Cromossomo 11 (Gene *MEN1*)

O estudo de 5 marcadores (D11S4191, PYGM, D11S987, D11S527 e D11S937), localizados na região 11q12.1-11q14.1, foi realizado a partir de DNA genômico pareado de sangue, lesão adrenal e tumor hipofisário e/ou pancreático nos pacientes 56, 57 e 58. No paciente 59, o pareamento foi realizado apenas no sangue e no tecido adrenal, pela não disponibilidade de outros tecidos tumorais. Todos os tumores foram informativos para pelo menos 2 dos 5 marcadores utilizados. Não foi observada a perda de heterozigose no DNA genômico de tecido adrenal

nos quatro pacientes estudados (Tabela 9). LOH de pelo menos 4 dos 5 marcadores foi observada apenas nos DNA dos tumores pancreáticos dos pacientes 57 e 58.

5.3.2 Cromossomo 17 (Gene *PRKAR1A*)

O estudo de microssatélite no DNA genômico do tecido adrenal do paciente 67 com PPNAD não revelou LOH (Tabela 10).

5.4 Estudo de Expressão dos genes do *LHCGR* e *GIPR*

5.4.1 Experimentos de Padronização de Curvas

A extração de RNA seguida de transcrição reversa foi realizada em todos os tecidos selecionados, bem como a amplificação dos genes alvos (*LHCGR* e *GIPR*) e do gene endógeno *β -actina*, como podemos observar nas figuras 8-10.

Figura 8. Curva de amplificação do LHCGR por PCR em tempo real

Figura 9. Curva de amplificação do GIPR por PCR em tempo real

Figura 10. Curva de amplificação da β -actina por PCR em tempo real

Foram realizados experimentos em *singleplex* e em *multiplex* para os genes de interesse (*LHCGR*, *GIPR* e β -*actina*) de forma a afastarmos a possibilidade de interferência da amplificação do gene alvo e do endógeno quando feita na mesma reação. Obtivemos resultados mais satisfatórios com as reações em *multiplex* para curva padrão uma vez que o valor da inclinação da reta foi próximo de - 3,3 e uma relação de equação da reta (r) $\geq 0,99$; e para as curvas de eficiência uma vez que a inclinação da reta foi $\leq 0,1$, demonstrando que o gene alvo e o gene endógeno têm uma eficiência equivalente de amplificação (Figuras 11-22).

Figura 11. Curva padrão para o gene do LHCGR, obtida a partir de reações em multiplex

Figura 12. Curva padrão para o gene da β -actina, obtida a partir de reações em multiplex

Figura 13. Curva de eficiência *LHCGR/ β-actina*, obtida a partir de reações em *multiplex*

Figura 14. Curva padrão para o gene do *LHCGR*, obtida a partir de reações em *singleplex*

Figura 15. Curva padrão para o gene da β -actina, obtida a partir de reações em singleplex

Figura 16. Curva de eficiência *LHCGR*/ β -actina obtida a partir de reações em singleplex

Figura 17. Curva padrão para o gene do *GIPR*, obtida a partir de reações em *multiplex*

Figura 18. Curva padrão para o gene da *β-actina* obtida a partir de reações em *multiplex*

Figura 19. Curva de eficiência *GIPR*/ β -actina obtida a partir de reações em *multiplex*

Figura 20. Curva padrão para o gene do *GIPR* obtida a partir de reações em *singleplex*

Figura 21. Curva padrão para o gene da β -actina obtida a partir de reações em *singleplex*

Figura 22. Curva de eficiência $GIPR$ / β -actina obtida a partir de reações em *singleplex*

5.4.2 Gene *LHCGR*

A expressão do *LHCGR* foi identificada em tecidos adrenais normais, tumorais e hiperplásicos (Figuras 23 e 24). A mediana do nível de expressão do RNAm do *LHCGR* nas 8 adrenais normais estudadas foi 2,5 variando de 1,3 a 9,6. O nível de expressão no *pool* de adrenais normais fetais (mediana = 0,84) foi similar ao encontrado no *pool* de adrenais normais de adultos (mediana = 1,0) (calibrador).

O nível de expressão do *LHCGR* foi significativamente maior em adultos com tumores adrenocorticais benignos (mediana = 2,3 variando de 0,1 a 30) quando comparado aos tumores malignos (mediana = 0,06, variando de 0,004 a 0,4) $p < 0,001$.

No grupo pediátrico, a expressão do *LHCGR* foi elevada tanto em tumores benignos (mediana = 4,3, variando de 0,3 a 47,7) quanto em malignos (mediana = 6,4, variando de 0,007 a 28,6) ($p=0.97$). Observou-se também que o nível de expressão deste receptor foi claramente maior nos tumores malignos do grupo pediátrico quando comparado aos tumores malignos em adultos, $p=0,007$.

Não foi observada nenhuma correlação entre o nível de expressão do *LHCGR* e os níveis hormonais dos pacientes com tumores adrenocorticais.

A mediana do nível de expressão do *LHCGR* foi 1,3 (variando de 0,05 a 3,0) nos pacientes com AIMAH; 0,7 (variando de 0,2 a 1,0) nos pacientes com MEN1 e 0,9 no paciente com PPNAD. Nos pacientes com AIMAH e MEN1, o nível de expressão deste receptor foi menor que o observado nas adrenais normais, $p= 0,02$ e $0,004$, respectivamente.

Figura 23. Expressão do *LHCGR* em 55 tumores: 37 benignos e 18 malignos em comparação a 8 adrenais normais. 20 TBA: tumores benignos em adultos; 10 TMA: tumores malignos em adultos; TBC: 17 tumores benignos em crianças; 8 TMC: tumores malignos em crianças; N: 8 adrenais normais.

Figura 24. Expressão do *LHCGR* em 12 hiperplasias adrenais (7 AIMAH; 4 MEN1; 1 PPNAD) comparado a 8 adrenais normais (N)

5.4.2 Gene *GIPR*

A expressão do *GIPR* foi identificada em todos os tecidos adrenais estudados (Figuras 25 e 26). Nas 8 adrenais normais o nível de expressão foi baixo com mediana= de 0,7, variando de 0,1 a 1,4. O nível de expressão no *pool* de adrenais normais fetais (mediana = 8,71) foi bem mais elevado que o encontrado no *pool* de adrenais normais de adultos (mediana = 1,0) (calibrador).

O nível de expressão do *GIPR* foi significativamente mais elevado em adultos com tumores adrenocorticais malignos (mediana = 4,8, variando de 1,1 a 21,3) quando comparado aos tumores benignos (mediana = 1,3, variando de 0,1 a 61,5) $p < 0,001$. No grupo pediátrico, a expressão do *GIPR* foi mais elevada em tumores malignos (mediana = 18,1 variando de 0,9 a 131,3) em comparação aos tumores benignos (mediana = 4,6, variando de 0,3 a 53,7) $p < 0,05$. O nível de expressão deste receptor não foi diferente nos tumores malignos do grupo pediátrico quando comparado ao grupo adulto $p = 0,23$.

Não foi observada nenhuma correlação entre o nível de expressão do *GIPR* e a produção hormonal dos pacientes com tumores adrenocorticais.

A mediana do nível de expressão do *GIPR* foi 1,6 (variando de 0,2 a 138,5) nos pacientes com AIMAH e 1,9 (variando de 0,3 a 4,8) naqueles com MEN1. No paciente com PPNAD, o nível de expressão foi de 0,2. Não houve diferença estatística significativa entre as diferentes formas de hiperplasias e as adrenais normais estudadas.

Figura 25. Expressão do *GIPR* em 55 tumores: 37 benignos e 18 malignos em comparação a 8 adrenais normais. 20 TBA: tumores benignos em adultos; 10 TMA: tumores malignos em adultos; TBC: 17 tumores benignos em crianças; 8 TMC: tumores malignos em crianças; N: 8 adrenais normais.

Figura 26. Expressão do *GIPR* em 12 hiperplasias adrenais (7 AIMAH; 4 MEN1; 1 PPNAD) comparado a 8 adrenais normais (N)

5.5 Imunohistoquímica para o GIPR

Os resultados da imunohistoquímica foram agrupados em duas categorias: considerou-se como resultado negativo a ausência de marcação do anticorpo ou uma pequena marcação (+) e como positivo uma marcação quantificada em ++ ou mais cruzes, como exemplificado nas figuras 27 e 28. A imunohistoquímica para o GIPR foi negativa em todos os tecidos adrenais normais, e positiva ($\geq$ ++) em todos os carcinomas do grupo pediátrico e em 7 dos 10 carcinomas do grupo adulto. Entretanto, quando tentamos correlacionar o nível de expressão do RNAm do *GIPR* com o nível de expressão da proteína avaliado pela imunohistoquímica, observou-se um $p=0,065$ e $0,436$ nos tumores adrenocorticais do grupo pediátrico e adulto, respectivamente.

Este resultado se deve provavelmente ao pequeno número de casos de carcinomas e ao fato de que em 4 adenomas (paciente 5, 10, 13 e 17) e 2 carcinomas (paciente 18 e 23) do grupo pediátrico (Tabela 3) e em 3 adenomas (paciente 38, 39 e 44) e 1 carcinoma (paciente 55) do grupo adulto (Tabela 4) ter se observado níveis de expressão do RNAm menores que o nível de expressão da proteína detectado pela imunohistoquímica.

Figura 27. Imunohistoquímica de tumores adrenocorticais (adenomas) com anticorpo policlonal para o GIPR. (A), (B) e (C) representam células em 100 e 400x de aumento, identificando células isoladas com coloração para o GIPR e portanto consideradas negativas.

Figura 28. Imunohistoquímica de tumores adrenocorticais (carcinomas) com anticorpo policlonal para o GIPR. (A), (B) e (C) representam células em 100 e 400x de aumento, identificando células difusamente coradas para o GIPR e portanto consideradas positivas.

6. DISCUSSÃO

Os aspectos clínicos e genéticos das neoplasias adrenocorticais têm sido intensamente estudados^{6, 11, 14, 26, 29-31, 35, 36}. Várias alterações genéticas, como mutações (*p53*), perda de heterozigose (17p13.1 e 11p15), bem como ganhos cromossômicos (9q34) podem estar relacionadas ao processo de iniciação e/ou progressão tumoral³¹⁻³⁵.

A tumorigênese é um processo constituído de múltiplas etapas que determinam a transformação progressiva de células normais em células malignas¹⁴⁶. É possível que algumas alterações genéticas presentes em doenças adrenocorticais benignas, tais como hiperplasia macronodular primária possam estar envolvidas no desenvolvimento dos tumores adrenocorticais⁷².

Alterações na atividade de receptores de membrana acoplados à proteína G têm sido identificadas em várias doenças endócrinas⁵. A presença destes receptores, com expressão anômala no córtex adrenal, está relacionada à hiperfunção (síndrome de Cushing, virilização ou hiperaldosteronismo) e à proliferação celular resultando em crescimento da glândula adrenal^{4, 46, 147, 148}. A resposta aberrante do córtex adrenal ao estímulo destes receptores foi descrita inicialmente em doenças com caráter evolutivo benigno, como a hiperplasia macronodular e adenomas. Apesar dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento e evolução

desta doença não estarem completamente definidos, a resposta do córtex adrenal ao estímulo destes receptores tornou-se um aspecto etiopatogênico marcante na AIMAH. A literatura descreve alguns casos familiares de AIMAH⁵⁰⁻⁵² e mais recentemente observou-se a presença destes receptores em tecido adrenal de algumas destas famílias⁵³.

Outra forma de hiperplasia adrenal, a PPNAD, apresenta características moleculares mais definidas, como a presença de mutações no gene *PRKAR1A* e mais recentemente no gene *PDE11A*; há ainda alguns casos de PPNAD que permanecem sem definição do diagnóstico molecular^{77, 78, 85}. A hiperexpressão do receptor do glicocorticoide tem sido associada à uma resposta paradoxal do cortisol, com incremento da sua secreção após o teste de supressão com baixas doses de dexametasona¹⁴⁹. Recentemente, a hiperexpressão de *GIPR* foi descrita em um caso de PPNAD associada ao complexo de Carney¹²⁶.

A neoplasia endócrina múltipla é uma doença com causa molecular definida, pela mutação do gene supressor tumoral *MEN1*, embora a causa para o aumento adrenal associado à síndrome MEN1 não tenha sido elucidada^{90, 94, 150}. Se a expressão anômala de receptores acoplados à proteína G poderia estar associada ao aumento adrenal presente nesta síndrome é algo ainda não estudado na literatura.

Neste estudo, comparamos a expressão do *LHCGR* e *GIPR* em um grupo amplo de pacientes com doenças adrenocorticais primárias, incluindo adultos e crianças com neoplasias adrenocorticais, pacientes com AIMAH, MEN1 e PPNAD. A expressão do *LHCGR* foi observada em todos os tecidos

adrenais estudados, incluindo as 8 adrenais normais, como descrito previamente¹³⁰. Pabon e colaboradores¹³⁰ demonstraram por hibridação *in situ* e por imunohistoquímica a presença do LHCGR na camada reticular e na porção mais profunda da camada fasciculada em 12 adrenais humanas em 4 homens e 8 mulheres. A atividade esteroidogênica deste receptor também foi demonstrada pela marcação combinada para este receptor e para a enzima de clivagem da cadeia lateral do P450 nas células adrenais.

Os nossos resultados demonstraram que os níveis de expressão do *LHCGR* em adultos foram significativamente mais elevados nos tumores adrenocorticais benignos quando comparados aos tumores malignos. No grupo pediátrico, o nível de expressão do *LHCGR* foi elevado tanto nos tumores benignos como nos tumores malignos. A comparação do nível de expressão dos tumores malignos entre os dois grupos revelou nível significativamente mais elevado no grupo pediátrico.

O *LHCGR* tem sido implicado no desenvolvimento de tumores adrenocorticais de algumas linhagens de camundongos e em outras espécies pós-gonadectomia, embora o seu envolvimento na tumorigênese adrenal em humanos não esteja bem definido^{43, 44}. Camundongos transgênicos para o promotor da subunidade α da inibina e antígeno T do vírus símio 40 desenvolvem tumores nas células da granulosa e nas células de Leydig aos 5-6 meses de vida com 100% de penetrância¹⁵¹. Observa-se que estes animais quando submetidos à gonadectomia para tratamento dos tumores gonadais, desenvolvem tumores adrenocorticais, o que não é observado nos animais transgênicos intactos ou não transgênicos

gonadectomizados. Em modelos transgênicos *knockout* para a subunidade α da inibina constata-se de forma semelhante o aparecimento de tumores adrenocorticais pós-gonadectomia^{152, 153}. Fêmeas de camundongos transgênicos que expressam uma proteína quimérica bLH β -CTP formada pela fusão da subunidade β do LH bovino e um fragmento da subunidade β do hCG humano apresentam elevação de LH, infertilidade, ovários policísticos e tumores ovarianos¹⁵⁴. Kero e colaboradores¹⁵⁵ demonstraram que a elevação crônica de LH, neste modelo animal, poderia contribuir para o aumento da expressão do seu receptor, embora outros fatores como a prolactina e/ou estradiol possam estar envolvidos neste fenômeno. Algumas evidências apontam que a elevação crônica de LH é um pré-requisito importante para o desenvolvimento tumoral nos três modelos de camundongos estudados: a hipofisectomia ou a supressão das gonadotropinas com agonistas do GnRH eliminam o efeito da gonadectomia em induzir aparecimento de tumores adrenocorticais.

Algumas cepas híbridas de camundongos também apresentam uma suscetibilidade natural ao aparecimento de tumores adrenocorticais. Camundongos DBA/2J e C3H tendem a desenvolver adenomas, enquanto as cepas CE desenvolvem principalmente carcinomas. Embora haja controvérsias, nestas cepas estes tumores tendem a se desenvolver a partir de dois tipos celulares distintos (células A e B) que se assemelham histologicamente e funcionalmente às células do estroma gonadal; enquanto em modelos de camundongos transgênicos e em outras espécies como a *Mustela putorius furo*¹⁵⁶ estes tumores se desenvolvem a partir de células

da zona X, uma camada subcapsular do córtex adrenal que se assemelha funcionalmente à zona fetal do córtex adrenal humano, porém ainda sem função definida ¹⁵⁶.

Em humanos, algumas evidências moleculares sugerem o aparecimento de tumores adrenocorticais, principalmente em crianças, a partir da zona fetal adrenal ¹⁵⁷. A zona fetal tem como função principal a produção de DHEAS como substrato da conversão placentária para o estradiol, o qual é de fundamental importância para sustentação da gravidez ¹⁵⁷. Existe uma semelhança entre o perfil de expressão gênica do córtex adrenal fetal normal e tumores adrenais ³². O hCG via LHCGR estimula a esteroidogênese adrenal e testicular do feto. Há evidências que este hormônio desempenhe um papel importante no crescimento e diferenciação de outros tecidos fetais ¹⁵⁸.

Os nossos resultados apontaram um perfil diferencial de expressão do *LHCGR* entre adultos e crianças. A hiperexpressão deste receptor nos tumores do grupo pediátrico, nos fez questionar se as diferenças no perfil de expressão entre os tumores adrenais de pacientes adultos e pediátricos poderiam ser explicadas pela presença de remanescentes do tecido adrenal fetal ³². Para esclarecer esta questão estudamos a expressão deste receptor em um *pool* comercial de adrenais fetais e de adultos. O perfil de expressão do *LHCGR* foi semelhante entre os dois grupos.

O papel do *LHCGR* tem sido pouco explorado no estudo da tumorigênese adrenal em humanos. Barbosa e colaboradores ⁴⁵ estudaram a expressão deste receptor em 23 tumores adrenocorticais (13 não

metastáticos e 10 metastáticos) em 15 adultos e 7 crianças (1 paciente apresentava tumor bilateral). Embora não tenha sido observada diferença estatística significativa entre os dois grupos, os achados sugerem a correlação entre a baixa expressão do *LHCGR* e um comportamento mais agressivo dos tumores adrenocorticais. Corroborando esta observação, estes autores observaram que um dos pacientes estudados com carcinoma metastático e hiperexpressão deste receptor apresentou longo tempo de sobrevida (± 11 anos de seguimento). Em nosso grupo adulto observamos praticamente ausência de expressão deste receptor nos tumores malignos quando comparado aos benignos e esta diferença foi significativa. Desta forma os nossos achados confirmaram que uma baixa expressão deste receptor estaria associada ao comportamento tumoral mais agressivo, diferente das descrições em outras espécies de animais ^{43-45, 156}.

A expressão do *GIPR* também foi demonstrada em todos os tecidos estudados. Nas adrenais normais observaram-se níveis baixos de expressão para este receptor. O padrão de expressão do *GIPR* foi 8 vezes mais elevado no *pool* de adrenal normal fetal quando comparado ao *pool* de adrenais de adultos.

A presença do *GIPR* em adrenais normais ainda permanece uma questão controversa na literatura. Chabre e colaboradores ¹¹⁸ demonstraram por RT-PCR semi-quantitativa, expressão de *GIPR* em tecido cerebral e em adrenal de um paciente com adenoma e síndrome de Cushing dependente do GIP. Estes autores não encontraram expressão deste receptor no tecido adrenal atrófico adjacente ao adenoma do paciente estudado, em adrenais

hiperplásicas de pacientes com Cushing ACTH dependente e em córtex adrenal normal. N'Diaye e colaboradores ¹²² observaram por hibridação *in situ* expressão de *GIPR* em tecido adrenal normal fetal e adulto, a qual não tinha sido detectada por RT-PCR. Entretanto, em experimentos de dispersão celular, não se observou aumento da produção do cortisol após estímulo destas células com GIP, as quais responderam ao estímulo com ACTH ¹²². Os nossos achados de expressão do *GIPR* por PCR em tempo real confirmaram a presença deste receptor em tecido adrenal normal adulto e fetal.

Contrariamente ao *LHCGR*, a expressão do *GIPR* foi elevada nos tumores malignos do grupo adulto e pediátrico. A expressão do *GIPR* em carcinomas adrenais humanos tem sido pouco avaliada na literatura. Groussin e colaboradores ¹²⁴ utilizando RT-PCR semiquantitativo não evidenciaram aumento da expressão deste receptor após a análise de 14 carcinomas adrenais de pacientes na faixa etária adulta. Contrariando estes achados, a hiperexpressão do *GIPR* foi observada nos nossos casos de carcinomas do córtex adrenal em pacientes adultos e pediátricos. Questionamos se essa diferença poderia ser atribuída à sensibilidade metodológica utilizada no estudo. A imunohistoquímica do *GIPR* confirmou a hiperexpressão do mesmo em todos os casos de carcinomas do grupo pediátrico e em 7 dos 10 tumores malignos no grupo adulto. Entretanto, não observamos uma correlação entre os níveis de RNAm do *GIPR* com a expressão de sua proteína no grupo de tumores estudados.

Mazzuco e colaboradores ¹⁴⁸ transfectaram o gene do receptor do *GIP* e posteriormente o gene do receptor do *LHCG* em células adrenocorticais

bovinas (BAC) ¹⁴⁷. Estas células (BAC) foram então transplantadas na cápsula renal de camundongos imunodeficientes adrenalectomizados. Somente as células que expressavam estes receptores formaram um tecido com alta taxa de proliferação celular, com característica histológica e imunohistoquímica compatível com tecido adrenocortical. A expressão destes receptores nestes tecidos resultou no aumento da produção de cortisol e diminuição do ACTH plasmático nos camundongos transplantados. Os camundongos apresentaram alterações semelhantes às encontradas em pacientes com síndrome de Cushing. Nenhum sinal de invasão celular foi observado nos tumores coletados 50 dias pós transplante ^{147, 148}.

Tanto o GIP quanto o GLP-1 (glucagon-like peptide-1) são incretinas que além de induzirem secreção de insulina pelas células β -pancreáticas em resposta ao aumento da glicose, têm sido implicados como reguladores da replicação das células beta e um efeito anti- apoptótico sobre as mesmas foi recentemente descrito ^{159, 160}. Análogos do GLP-1 têm sido utilizados no tratamento de Diabetes tipo 2 uma vez que este hormônio tem ação tanto na biossíntese de insulina, como ações estimulatórias na expressão do gene da insulina e na neogênese e na replicação de células β -pancreáticas *in vivo* e *in vitro* ¹⁶¹. O GIP também é descrito como um fator de crescimento de uma linhagem celular de insulinoma, células INS-1 ¹⁵⁹. Alguns experimentos demonstram que a ação proliferativa do *GIPR* pode ser desempenhada não só pela ativação do AMPc como segundo mensageiro, mas por uma estimulação direta na síntese de DNA ¹¹⁸. Adicionalmente, observa-se hiperplasia de células β -pancreáticas após estímulo com GIP ¹⁶².

O aumento da expressão do *GIPR* observado nos carcinomas do córtex adrenal, estudados neste trabalho, pode estar correlacionado a alta taxa de proliferação dos mesmos. Em um trabalho desenvolvido por Huang e colaboradores¹⁶³ a expressão aumentada de *GIPR* foi descrita em um grupo de genes associados à recorrência de carcinoma de mama.

Em resumo, um nível alto de expressão do *GIPR* foi demonstrado nos tumores malignos. Contrariamente, um nível baixo de expressão do *LHCGR* foi observado nos tumores malignos do grupo adulto. Estes achados sugerem que o perfil de expressão do *GIPR* e do *LHCGR* possa contribuir no diagnóstico diferencial inicial dos tumores adrenocorticais. Além disso um padrão diferente de expressão desses dois receptores acoplados à proteína G nos tumores de pacientes adultos e pediátricos reitera as diferenças de comportamento clínico e molecular dos tumores adrenocorticais nestes dois grupos de pacientes.

No que se refere aos pacientes com hiperplasia, identificou-se 2 casos de AIMAH familiar com incremento do cortisol ao estímulo da metoclopramida, compatível com a presença de expressão anômala para o receptor da serotonina. O receptor 5-HT₄ é um receptor eutópico, que desempenha um papel na secreção de aldosterona em humanos, mas não do cortisol em indivíduos normais⁴. A hiperexpressão deste receptor é descrita principalmente em associação a outros receptores, como *LHCGR*, V1-vasopressina e receptores β -adrenérgicos embora também seja associada de forma isolada ao hipercortisolismo de alguns casos de AIMAH^{65, 67, 68, 164}. Nos nossos casos, a expressão deste receptor não foi

estudada, embora diante de uma resposta positiva aos testes de *screening*, consideremos que a sua presença esteja associada à expressão de ambos receptores estudados neste trabalho.

No processo de triagem e caracterização molecular dos pacientes com neoplasia endócrina múltipla (MEN1 ou complexo de Carney) foram encontradas três mutações no gene *MEN1*, duas já descritas na literatura (893 + 1G>A, W183X) ^{165, 166}, e duas mutações novas, A68fsX118 no gene *MEN1* e a Y21X no *PRKAR1A*.

O estudo da perda de heterozigose do DNA tumoral das adrenais dos 4 pacientes com MEN1 e do paciente com PPNAD demonstrou presença dos 2 alelos no DNA destes tecidos, o que reforça os achados da literatura onde também não foi descrito a perda de heterozigose ^{82, 97}.

O nível de expressão do *LHCGR* e do *GIPR* foi semelhante nas três formas de hiperplasias estudadas. Ainda não há descrição na literatura de uma causa que justifique o aumento adrenal associado à neoplasia endócrina múltipla tipo1. A associação entre o aumento da adrenal nesta síndrome e a presença de tumores pancreáticos tem sido descrita, sugerindo que fatores hormonais pancreáticos possam estar envolvidos na doença adrenal associada à MEN1 ⁹⁰. Neste contexto a expressão do *GIPR* foi estudada nestes pacientes e em 2 deles o nível de expressão foi mais elevado que o valor médio de expressão nas adrenais normais. Apesar desta diferença não apresentar significância estatística, acreditamos que um número maior de pacientes com MEN1 possa definir a importância deste achado.

Recentemente a expressão aberrante dos receptores do *LHCG* e do *GIP* foi associada ao desenvolvimento de adenomas produtores de aldosterona ^{46, 167}. A expressão do *LHCGR* foi mais elevada em 9 dos 18 aldosteronomas estudados quando comparados a 20 adrenais normais ⁴⁶. Os autores também demonstraram em uma linhagem de células de carcinoma adrenal (células NCI H295R) transfectadas com o *LHCGR* que o LH pode aumentar a transcrição da aldosterona sintetase, o que sugere que *in vivo* o LH poderia levar ao aumento da produção de aldosterona no córtex adrenal. Um dos nossos casos estudados de MEN1 apresentava hiperaldosteronismo, mas a expressão tanto do *LHCGR* quanto do *GIPR* não foi diferente dos outros casos de MEN1 incluídos neste trabalho.

7. CONCLUSÕES

1. O gene *MEN1* não desempenha papel importante no acometimento adrenal dos pacientes com neoplasia endócrina múltipla tipo 1. A presença de LOH e mutação em heterozigose composta deste gene foram afastadas como mecanismos responsáveis pelo aumento adrenal nos pacientes com esta síndrome.
2. Perda de heterozigose do gene *PRKAR1A* foi afastada como causa de PPNAD no paciente com complexo de Carney.
3. A expressão do *LHCGR* foi significativamente menor nos carcinomas do grupo adulto e hiperexpressão de *GIPR* está associada a malignidade dos tumores adrenocorticais no grupo adulto e pediátrico. Desta forma, o perfil de expressão destes receptores pode contribuir no diagnóstico inicial diferencial dos tumores adrenocorticais.
5. Um padrão diferente de expressão desses dois receptores nos tumores, examinados em população adulta e pediátrica, reitera as diferenças de comportamento clínico e molecular dos tumores adrenocorticais nestes dois grupos de pacientes.

6. Os nossos achados de expressão do *GIPR* por PCR em tempo real confirmaram a presença deste receptor em tecido adrenal normal adulto e fetal.
7. Não houve diferença do nível de expressão do *LHCGR* e do *GIPR* nas diferentes formas de hiperplasia adrenal.

8. ANEXOS

TABELA 1. Critérios de Weiss

-
1	Grau nuclear III ou IV baseado no critério de Fuhrman.
2	> 5 mitoses/50HPF (objetiva 40x) analisando 10 campos ao acaso em uma área de maior número de mitoses em 5 lâminas com maior número de mitoses.
3	Presença de figuras de mitose atípicas (distribuição anormal de cromossomos ou número excessivo de fuso mitótico).
4	Células claras ou vacuoladas em 25% ou menos da área tumoral.
5	Arquitetura difusa (mais do que 1/3 do tumor formando camadas de células sem padrão). Arquitetura trabecular, em cordão, coluna ou alveolar não é considerada difusa.
6	Necrose microscópica.
7	Invasão venosa (veias devem ter musculatura lisa na parede; células tumorais formam projeções polipóides, em grupos ou camadas, na luz do vaso ou trombos tumorais polipóides cobertos por camada endotelial).
8	Invasão sinusoidal (sinusóide é um vaso endotelial alinhado na glândula adrenal com pouco tecido de sustentação; considere somente sinusóides dentro do tumor).
9	Invasão capsular (redes ou cordões de tumor se estendendo para dentro ou através da cápsula com uma reação estromal), completa ou incompleta.
-

O critério de Weiss¹⁶ é utilizado da seguinte forma: 1 para o critério presente e 0 para o critério ausente. Escore de 4 ou mais sugere malignidade para pacientes adultos.

TABELA 2. Estadiamento dos tumores adrenocorticais

ESTÁDIO	T, N, M	<u>DESCRIÇÃO</u>
I	T1,N0,M0	Tumor < 5cm, restrito à glândula adrenal
II	T2,N0,M0	Tumor > 5cm, restrito à glândula adrenal
III	T1 ou T2, N1,M0 ou T3,N0,M0	Tumor restrito à glândula adrenal com envolvimento de linfonodos locais. ou tumor se estendendo à partir da glândula adrenal, mas não invadindo órgãos adjacentes.
IV	T3 OU T4,N1,M0 ou qualquer T,M1	Tumor se estendendo à partir da glândula adrenal, invadindo órgãos adjacentes e envolvendo linfonodos locais. ou qualquer tumor com metástase.

T, Tumor; N, linfonodo; M, metástases; 0, negativo. (Sullivan e colaboradores, 1978; adaptado de Macfarlane, 1958) ^{140, 141}.

TABELA 3. Dados clínicos, histopatológicos, de expressão para o GIPR e LHCGR e de imunohistoquímica para o GIPR em 25 crianças com tumores adrenocorticais

Paciente	Idade	Sexo	Clínica	Tumor	Weiss	MacFarlane	Seguimento	Diagnóstico	Expressão	Expressão	IMH
(N)	(Anos)			Peso (g)			(Anos)	Histológico	LHCGR	GIPR	GIPR
1	1,3	M	V	30	IV	I	11,0	Adenoma	1,8	4,1	-
2	2,3	F	V	5	V	I	2,4	Adenoma	2,8	4,6	++
3	0,9	F	V/C	60	III	II	1,4	Adenoma	6,7	12,1	++
4	2,2	M	V	90	IV	II	10,3	Adenoma	4,6	5,4	-
5	2,1	F	V	5	II	I	8,0	Adenoma	1,4	1,1	+++
6	2,1	M	V	135	V	II	6,9	Adenoma	2,4	53,7	+++
7	1,3	M	V/C	40	I	I	7,2	Adenoma	0,3	6,8	+++
8	2,5	F	V	55	VII	II	4,5	Adenoma	7,9	6,1	+++
9	1,7	F	V	ND	III	II	10,0	Adenoma	4,2	11,8	-
10	9	M	C	20	II	I	4,9	Adenoma	0,5	0,8	+++
11	6	F	V/C	45	II	I	7,0	Adenoma	8,7	6,4	-
12	2,8	F	V	30	II	I	11,0	Adenoma	47,7	1,3	-
13	2,2	F	V/C	55	II	II	3,0	Adenoma	0,5	0,8	+++
14	2,5	F	V	10	I	I	2,0	Adenoma	19,1	2,1	++
15	2,1	F	V	20	I	I	1,5	Adenoma	43,5	0,8	-

Continua...

TABELA 3 (continuação). Dados clínicos, histopatológicos, de expressão para o GIPR e LHCGR e de imunohistoquímica para o GIPR em 25 crianças com tumores adrenocorticais

16	1,6	F	V	ND	ND	I	5,0	Adenoma	33,5	8,2	-
17	18	F	C	20	III	I	6,5	Adenoma	1,1	0,3	++
18	2,6	M	V	70	VII	IV	1,4	Carcinoma	4,3	0,9	+++
19	0,9	F	V	135	VII	IV	2,0	Carcinoma	13,1	6,8	++
20	2	F	V/C	55	VII	IV	2,4	Carcinoma	2,3	58,1	+++
21	2,6	M	V	3	VII	IV	9,6	Carcinoma	15,6	130,8	+++
22	15	F	V/C	1230	VII	IV	2,9	Carcinoma	8,5	11,5	+++
23	17	M	f/C	165	VII	III	1,7	Carcinoma	0,007	1,3	+++
24	18	F	V/C	1000	VII	IV	1,8	Carcinoma	28,6	131,3	+++
25	17	F	V	825	IV	III	3,2	Carcinoma	0,06	24,5	+++
Adrenal Normal									2,5	0,7	-
Testículo Normal									45,3		
Pâncreas Normal										74,4	++++

C, síndrome de Cushing; f, feminização; F, feminino; IMH, imunohistoquímica; M, masculino; N, número; ND, não disponível; V, virilização;

- Ausência de marcação para o GIPR;

++ Marcação para o GIPR menor que 50% das células adrenais tumorais;

+++ Marcação para o GIPR maior que 50% das células adrenais tumorais;

++++ Marcação para o GIPR em 100% das células pancreáticas.

TABELA 4. Dados clínicos, histopatológicos, níveis de expressão do *GIPR* e do *LHCGR* e imunohistoquímica para o *GIPR* em 30 pacientes adultos com tumores adrenocorticais

Paciente (N)	Idade (Anos)	Sexo	Clínica	Tumor Peso (g)	Weiss	MacFarlane Estádio	Seguimento (Anos)	Diagnostico Histológico	Expressão LHCGR	Expressão GIPR	IMH GIPR
26	37	F	C	20	II	I	1,5	Adenoma	2,4	1,4	-
27	27	F	C	5	II	II	8,1	Adenoma	2,3	0,5	-
28	46	F	NF	30	I	I	2,3	Adenoma	0,1	1,6	++
29	35	F	V/C	40	III	I	4,0	Adenoma	30	3,3	+++
30	29	F	C	20	I	I	9,8	Adenoma	2,1	4,0	-
31	38	F	C	45	I	I	11,6	Adenoma	7,8	2,4	+++
32	26	F	C	30	I	I	4,3	Adenoma	4,5	1,7	-
33	50	F	V	35	III	I	5,5	Adenoma	0,3	1,4	-
34	37	F	C	15	I	I	4,7	Adenoma	3,5	0,1	-
35	47	F	C	5	I	I	6,3	Adenoma	0,6	0,4	-
36	49	M	NF	10	I	I	2,5	Adenoma	1,3	1,1	++
37	40	F	NF	10	I	I	10,5	Adenoma	0,7	1,3	-
38	64	F	C	15	I	I	2,0	Adenoma	0,3	0,2	+++
39	39	F	C	10	I	I	8,2	Adenoma	7,0	1,2	+++
40	27	F	C	20	I	I	ND	Adenoma	1,6	0,6	-
41	37	F	C	25	I	I	9,4	Adenoma	18	4,7	++
42	45	F	NF	20	ND	I		Adenoma	2,6	1,3	-

Continua...

TABELA 4 (continuação). Dados clínicos, histopatológicos, níveis de expressão do *GIPR* e do *LHCGR* e imunohistoquímica para o *GIPR* em 30 pacientes adultos com tumores adrenocorticais

43	28	F	V	150	II	II	3,0	Adenoma	0,3	61,5	+++
44	24	F	C	15	II	I	8,7	Adenoma	0,6	0,3	+++
45	41	F	C	ND	I	I	13	Adenoma	11,1	0,7	-
46	66	F	NF	55	IV	II	1,6	Carcinoma	0,3	21,3	-
47	29	M	C	665	VIII	IV	1,4	Carcinoma	0,3	4,1	++
48	33	M	NF	ND	V	III	2,3	Carcinoma	0,004	5,4	-
49	30	M	NF	330	IV	IV	2,0	Carcinoma	0,4	19,5	+++
50	45	F	V/C	280	VII	III	6,5	Carcinoma	0,004	2,1	+++
51	49	F	V/C	930	IV	III	7,0	Carcinoma	0,06	1,7	++
52	23	F	V/C	555	VI	IV	2,4	Carcinoma	0,06	20,5	+++
53	29	F	V/C	550	IV	IV	3,5	Carcinoma	0,13	2,6	+++
54	22	F	V	374	VII	IV	1,8	Carcinoma	0,01	7,3	-
55	44	F	V	810	VIII	III	1,7	Carcinoma	0,01	1,1	+++
Adrenal Normal									2,5	0,7	-
Testículo Normal									45,3		
Pâncreas Normal										74,4	++++

C, síndrome de Cushing; F, feminino; IMH, imunohistoquímica; M, masculino; N, número; ND, não disponível; NF, não funcionante; V, virilização;

- Ausência de marcação para o *GIPR*;

++ Marcação para o *GIPR* menor que 50% das células adrenais tumorais;

+++ Marcação para o *GIPR* maior que 50% das células adrenais tumorais;

++++ Marcação para o *GIPR* em 100% das células pancreáticas.

TABELA 5. Dados clínicos e moleculares dos pacientes com hiperplasia adrenocortical primária

Pacientes N	Idade (Anos)	Sexo	Fenótipo	Alterações genéticas	Diagnóstico	Expressão LHCGR	Expressão GIPR
56	53	F	Hiperparatireoidismo Adenoma hipofisário Hiperaldosteronismo	S145S / D419D (<i>MEN1</i>)	MEN1	0,5	0,3
57	37	F	Hiperparatireoidismo Macroprolactinoma Doença de Cushing + nódulos adrenais	893 + 1G>A (<i>MEN1</i>)	MEN1	1,0	4,8
58	37	F	Hiperparatireoidismo Tumor pancreático Hiperplasia adrenal	W 183 X (<i>MEN1</i>)	MEN1	0,9	2,5
59	59	M	Hiperparatireoidismo Nódulos adrenais Tumor pancreático	A68fsX118 (<i>MEN1</i>)		0,2	1,2

Continua...

TABELA 5 (continuação). Dados clínicos e moleculares dos pacientes com hiperplasia adrenocortical primária

60	34	F	Síndrome de Cushing	R201S (<i>GNAS1</i>)	AIMAH	0,9	138,5
61	53	F	Síndrome de Cushing	-	AIMAH	1,3	13,1
62	26	F	Síndrome de Cushing	*	AIMAH	3,0	1,6
63	69	F	Síndrome de Cushing	-	AIMAH	1,3	0,8
64	51	F	Síndrome de Cushing	-	AIMAH	0,8	0,6
65	45	F	Síndrome de Cushing	-	AIMAH	2,1	3,0
66	44	M	Síndrome de Cushing	-	AIMAH	0,05	0,2
67	18	M	Síndrome de Cushing	Y21X(<i>PRKAR1A</i>)	PPNAD	0,9	0,2
Adrenal						2,5	0,7
Normal							
Testículo						45,3	
Normal							
Pâncreas							74,4
Normal							

F, feminino; M, masculino; N, número; * mutação do *GNAS1* ausente.

TABELA 6. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo do gene *MEN1*

Exons	Oligonucleotídeos Iniciadores	Sequência	Fragmentos (pb)	Temperatura Hibridação °C
	Intrônicos	5' → 3'		
2	HF	TTA GCG GAC CCT GGG AGG AG	226	58
	HR	TCC ACG AAG CCC AGC ACC AAG		
	AF	TTG CCT TGC AGG CCG CCG CC	202	58
	AR	TGG TAG GGA TGA CGC GGT TG		
	BF	GGC TTC GTG GAG CAT TTT CT	201	58
	BR	CTC GAG GAT AGA GGG ACA GG		
	JF	CTG GCG GCC TCA CCT ACT TTC	151	58
	JR	GGA GAC CTT CTT CAC CAG CTC AC		
	CF	TTC ACC GCC CAG ATC CGA GG	195	60
	CR	TAA GAT TCC CAC CTA CTG GG		
3	3F	GAGTGGGAGGGCGTGTGG	338	61
	3R	CAGTATGAAGGGGACAAGG		
4	4F	ACAGGGTGGGCCATCATGAGACAT	226	58
	4R	AGCAAGTCAAGTCTGGCCTAGCC		
5-6	5-6F	ACCCGTTCTCCTCCCTGTTC	348	55
	5-6R	AAAGTTCTCTTCTCATCTGCCC		
7	7F	GGACTCCCTGGGATCTTCCTGTG	322	60
	7R	GGACGAGGGTGGTTGGAAGTCTG		
8	8F	TGGTGAGACCCCTTCAGACCCTAC	278	60
	8R	CCATCCCTAATCCCGTACATGC		
9	9F	GGGGTGAGTAAGAGACTGATC	277	55
	9R	GTCTGACAAGCCCGTGGCTGC		
10	10F	CCATCCCCTTCGGTGCCGAT	672	58
	10R	GGCTCAGAGTTGGGGGGACTAA		
	Exônicos			
2 e 3	cAF	ATGGGGCTGAAGGCCGCCAGAAGA	511	67
	cAR	CAGGCCCCAACCCACAGCAAAGGCCAC		
3-5	cBF	GCACCAAATTGGACAGCTCC	379	58
	cBR	CTTTCCAGATGTCCCAGGTCA		
5-9	cCF	AGCTGCTCTGGCTGCTCTAT	568	59
	cCR	CTGTCCCTCAAAACGGCCTA		
9 e 10	cDF	TGGGCCACCTTTCTTGTGCAGTC	671	62
	cDR	ACTGTACTCGGGACCGGGAACCT		

F, Forward (sense); R, Reverse (anti-sense).

TABELA 7. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo do gene *PRKAR1A*

Exons	Oligonucleotídeos	Sequência	Fragmentos	Temperatura
	Iniciadores	5' → 3'	(pb)	Hibridação °C
5'(CA)n	F	CATGGCCACACAGCTAACAT	167	62
	R	CCCCCACTGTACTGAACACC		
Exon 1A	1AF	AGTCGCCCACCTGTCATCT	284	58
	1AR	CACTTCTCCTTTCCGCAGTC		
Exon 1B	1BF	CATTGACGTCAGTAGCCGAA	254	58
	1BR	ATCTTGGATCGGTCCAGCTC		
Exon 2	2F	CCTAGTCCCCACTTCCCTGT	364	54
	2R	ATCACCTCATCATCTCCCCA		
Exon 3	3F	CATGCCGAAGGATCTCATTT	327	54
	3R	ATGGATGAAGTTCCACCCTG		
Exon 4A	4AF	CAGGTTGCAAACGTGAAATG	397	57
	4AR	CTGCGATAAAGGAGACCGAA		
Exon 4B	4BF	AGCCAAAGCCATTGAAAAGA	362	57
	4BR	GCCTCCTCTCCCGTAACAAT		
Exon 5	5F	TTGCTTGATTTTCTTTCCCC	270	53
	5R	ATTCTTATTGCTCGGAAGCG		
Exon 6	6F	TCATTTAACTCGTCAGAAATCACC	370	53
	6R	TTCTAAATCACACTCTCAAACACCA		
Exon 7	7F	GGCATAATATTGGCGGAAAA	363	55
	7R	AAGGCTTTTCCCAAGTCCAT		
Exon 8	8F	AGAATGTTGAATGGGCATGG	331	55
	8R	TTAGCCCACTCTTTCCCTCTT		
Exon 9	9F	CACCCTGGGTTTGAGAGTGT	272	57
	9R	TTCCCTCTCAGAGCCAAAAA		
Exon 10	10F	CCCATCTTTGCTTTCTCCAG	314	57
	10R	AACAGACAGGAAGCTGCGAT		

F, *Foward* (sense); R, *Reverse* (anti-sense).

TABELA 8. Localização dos microssatélites e sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação do DNA genômico dos pacientes com MEN1

Marcadores	Locus	Oligonu- cleotídeos	Seqüência 5' → 3'	Fragmentos (pb)	Temperatura Hibridação °C
		Iniciadores			
D11S4191	11q12.1	F	TTTTGGTTGGAATGTAGTTGTTTAT	89-119	55
		R	GCAAGATGGCCAATTAGAAG		
PYGM	11q13.1	F	CTAGCAGAGTCCACCTACTG	156-190	58
		R	GCTGTCAGGTAGCAACTGAC		
D11S987	11q12-q13.5	F	TACGGCACGCAGATGTAAAA	94-134	55
		R	CCACGAGTGTTTAGCTGCTG		
D11S527	11q13.5	F	GCCCCCTCTACTTGTCTGGAG	142-166	58
		R	ATGCGGCTCCAAGACAAGTTC		
D11S937	11q14.1	F	CTAATAAACAAATCCCTCTACCTCC	144-180	55
		R	TAGTCAGTCAGGGACCCAAGT		

F, *Foward* (sense); R, *Reverse* (anti-sense).

TABELA 9. Distribuição dos alelos dos microsátélites utilizados no estudo de LOH nos pacientes com MEN1

Pacientes	Tecidos	D11S4191	PYGM	D11S987	D11S527	D11S937
N						
56	Sangue	91/95	169/171	120/132	145/161	148/166
	Adrenal	91/95	169/171	120/132	145/161	148/166
	Tu hipofisário	-	169/171	-	145/161	148/166
57	Sangue	95/107	175/183	116/116	143/145	156/160
	Adrenal D	95/107	175/183	116/116	143/145	156/160
	Adrenal E	95/107	175/183	116/116	143/145	156/160
	Tu pancreático	95	183	116/116	143	156
58	Sangue	97/119	167/173	120/122	147/157	160/160
	Adrenal	-	167/173	120/122	-	160/160
	Tu pancreático	97	167	120	147	160/160
59	Sangue	89/91	169/171	120/120	142/159	152/160
	Adrenal	89/91	169/171	120/120	142/159	152/160

N, número; Tu, tumor; -, (resultado não disponível).

TABELA 10. Distribuição dos alelos do marcador intragênico utilizado no estudo de LOH no paciente com PPNAD

Paciente N	Tecidos	Marcador 5'(CA)n
67	Sangue	143/145
	Adrenal	143/145

N, número.

9. REFERÊNCIAS

1. Cushing, H. The Basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations. *Bull. John Hopkins Hosp* 1932; 50:137-95.
2. Newell-Price, J, Morris, DG, Drake, WM, Korbonits, M, Monson, JP, Besser, GM, Grossman, AB. Optimal response criteria for the human CRH test in the differential diagnosis of ACTH-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1640-5.
3. Newell-Price, J, Trainer, P, Besser, M, Grossman, A. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. *Endocr Rev* 1998; 19:647-72.
4. Lacroix, A, Ndiaye, N, Tremblay, J, Hamet, P. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocr Rev* 2001; 22:75-110.
5. Lacroix, A, Baldacchino, V, Bourdeau, I, Hamet, P, Tremblay, J. Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15:375-82.
6. de Fraipont, F, El Atifi, M, Cherradi, N, Le Moigne, G, Defaye, G, Houlgatte, R, Bertherat, J, Bertagna, X, Plouin, PF, Baudin, E, Berger, F, Gicquel, C, Chabre, O, Feige, JJ. Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:1819-29.

7. Libe, R, Bertherat, J. Molecular genetics of adrenocortical tumours, from familial to sporadic diseases. *Eur J Endocrinol* 2005; 153:477-87.
8. Allolio, B, Fassnacht, M. Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:2027-37.
9. Kirschner, LS. Emerging treatment strategies for adrenocortical carcinoma: a new hope. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:14-21.
10. Ribeiro, RC, Sandrini Neto, RS, Schell, MJ, Lacerda, L, Sambaio, GA, Cat, I. Adrenocortical carcinoma in children: a study of 40 cases. *J Clin Oncol* 1990; 8:67-74.
11. Latronico, AC, Pinto, EM, Domenice, S, Fragoso, MC, Martin, RM, Zerbini, MC, Lucon, AM, Mendonca, BB. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4970-3.
12. Ribeiro, RC, Sandrini, F, Figueiredo, B, Zambetti, GP, Michalkiewicz, E, Lafferty, AR, DeLacerda, L, Rabin, M, Cadwell, C, Sampaio, G, Cat, I, Stratakis, CA, Sandrini, R. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:9330-5.
13. Pinto, EM. *Presença da mutação Arg337His do supressor tumoral p53 e mapa de deleção do cromossomo 17 em crianças e adultos com tumores adrenocorticais*. (Tese de doutorado) Fisiopatologia Experimental. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2005.
14. Latronico, AC, Chrousos, GP. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:1317-24.

15. Mendonca, BB, Lucon, AM, Menezes, CA, Saldanha, LB, Latronico, AC, Zerbini, C, Madureira, G, Domenice, S, Albergaria, MA, Camargo, MH, et al. Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenocortical neoplasms in childhood and adulthood. *J Urol* 1995; 154:2004-9.
16. Weiss, LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol* 1984; 8:163-9.
17. Weiss, LM, Medeiros, LJ, Vickery, AL, Jr. Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1989; 13:202-6.
18. Hough AJ, HJ, Page DL, Hartmann WH. Prognostic factors in adrenal cortical tumors. A mathematical analysis of clinical and morphologic data. *Am J Clin Pathol* 1979; 72:390-399.
19. Van Slooten H, SA, Smeenk D, Moolenaar AJ. Morphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer* 1985:766-773.
20. Medeiros LJ., WM. New developments in the pathologic diagnosis of adrenal cortical neoplasms. *Am J Clin Pathol* 1992; 97:73-81.
21. Wieneke, JA, Thompson, LD, Heffess, CS. Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. *Am J Surg Pathol* 2003; 27:867-81.
22. Koch, CA, Pacak, K, Chrousos, GP. The molecular pathogenesis of hereditary and sporadic adrenocortical and adrenomedullary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:5367-84.

23. Li, FP, Fraumeni, JF, Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 1969; 71:747-52.
24. Sameshima, Y, Tsunematsu, Y, Watanabe, S, Tsukamoto, T, Kawa-ha, K, Hirata, Y, Mizoguchi, H, Sugimura, T, Terada, M, Yokota, J. Detection of novel germ-line p53 mutations in diverse-cancer-prone families identified by selecting patients with childhood adrenocortical carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:703-7.
25. Malkin, D, Li, FP, Strong, LC, Fraumeni, JF, Jr., Nelson, CE, Kim, DH, Kassel, J, Gryka, MA, Bischoff, FZ, Tainsky, MA, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990; 250:1233-8.
26. Pinto, EM, Billerbeck, AE, Fragoso, MC, Mendonca, BB, Latronico, AC. Deletion mapping of chromosome 17 in benign and malignant adrenocortical tumors associated with the Arg337His mutation of the p53 tumor suppressor protein. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:2976-81.
27. Beckwith, J. Macroglossia, omphalocele, adrenal cytomegaly, gigantism and hyperplastic visceromegalie. *Birth Defects* 1969; 5:188-196.
28. Henry, I, Jeanpierre, M, Couillin, P, Barichard, F, Serre, JL, Journal, H, Lamouroux, A, Turleau, C, de Grouchy, J, Junien, C. Molecular definition of the 11p15.5 region involved in Beckwith-Wiedemann syndrome and probably in predisposition to adrenocortical carcinoma. *Hum Genet* 1989; 81:273-7.
29. Gicquel, C, Le Bouc, Y. Molecular markers for malignancy in adrenocortical tumors. *Horm Res* 1997; 47:269-72.

30. Wilkin, F, Gagne, N, Paquette, J, Oligny, LL, Deal, C. Pediatric adrenocortical tumors: molecular events leading to insulin-like growth factor II gene overexpression. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2048-56.
31. Gicquel, C, Bertagna, X, Gaston, V, Coste, J, Louvel, A, Baudin, E, Bertherat, J, Chapuis, Y, Duclos, JM, Schlumberger, M, Plouin, PF, Luton, JP, Le Bouc, Y. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res* 2001; 61:6762-7.
32. West, AN, Neale, GA, Pounds, S, Figueredo, BC, Rodriguez Galindo, C, Pianovski, MA, Oliveira Filho, AG, Malkin, D, Lalli, E, Ribeiro, R, Zambetti, GP. Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res* 2007; 67:600-8.
33. Kjellman, M, Kallioniemi, OP, Karhu, R, Hoog, A, Farnebo, LO, Auer, G, Larsson, C, Backdahl, M. Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. *Cancer Res* 1996; 56:4219-23.
34. Figueiredo, BC, Stratakis, CA, Sandrini, R, DeLacerda, L, Pianovsky, MA, Giatzakis, C, Young, HM, Haddad, BR. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:1116-21.
35. Figueiredo, BC, Cavalli, LR, Pianovski, MA, Lalli, E, Sandrini, R, Ribeiro, RC, Zambetti, G, DeLacerda, L, Rodrigues, GA, Haddad, BR. Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:615-9.

36. Latronico, AC, Reincke, M, Mendonca, BB, Arai, K, Mora, P, Allolio, B, Wajchenberg, BL, Chrousos, GP, Tsigos, C. No evidence for oncogenic mutations in the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:875-7.
37. Light, K, Jenkins, PJ, Weber, A, Perrett, C, Grossman, A, Pistorello, M, Asa, SL, Clayton, RN, Clark, AJ. Are activating mutations of the adrenocorticotropin receptor involved in adrenal cortical neoplasia? *Life Sci* 1995; 56:1523-7.
38. Swords, FM, Baig, A, Malchoff, DM, Malchoff, CD, Thorner, MO, King, PJ, Hunyady, L, Clark, AJ. Impaired desensitization of a mutant adrenocorticotropin receptor associated with apparent constitutive activity. *Mol Endocrinol* 2002; 16:2746-53.
39. Reincke, M, Mora, P, Beuschlein, F, Arlt, W, Chrousos, GP, Allolio, B. Deletion of the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical tumors: implications for tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3054-8.
40. Sachse, R, Shao, XJ, Rico, A, Finckh, U, Rolfs, A, Reincke, M, Hensen, J. Absence of angiotensin II type 1 receptor gene mutations in human adrenal tumors. *Eur J Endocrinol* 1997; 137:262-6.
41. Tanabe, A, Naruse, M, Arai, K, Naruse, K, Yoshimoto, T, Seki, T, Imaki, T, Miyazaki, H, Zeng, ZP, Demura, R, Demura, H. Gene expression and roles of angiotensin II type 1 and type 2 receptors in human adrenals. *Horm Metab Res* 1998; 30:490-5.
42. Schubert, B, Fassnacht, M, Beuschlein, F, Zenkert, S, Allolio, B, Reincke, M. Angiotensin II type 1 receptor and ACTH receptor expression in human adrenocortical neoplasms. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001; 54:627-32.

43. Bielinska, M, Parviainen, H, Porter-Tinge, SB, Kiiveri, S, Genova, E, Rahman, N, Huhtaniemi, IT, Muglia, LJ, Heikinheimo, M, Wilson, DB. Mouse strain susceptibility to gonadectomy-induced adrenocortical tumor formation correlates with the expression of GATA-4 and luteinizing hormone receptor. *Endocrinology* 2003; 144:4123-33.
44. Rahman, NA, Kiiveri, S, Rivero-Muller, A, Levallet, J, Vierre, S, Kero, J, Wilson, DB, Heikinheimo, M, Huhtaniemi, I. Adrenocortical tumorigenesis in transgenic mice expressing the inhibin alpha-subunit promoter/simian virus 40 T-antigen transgene: relationship between ectopic expression of luteinizing hormone receptor and transcription factor GATA-4. *Mol Endocrinol* 2004; 18:2553-69.
45. Barbosa, AS, Giacaglia, LR, Martin, RM, Mendonca, BB, Lin, CJ. Assessment of the role of transcript for GATA-4 as a marker of unfavorable outcome in human adrenocortical neoplasms. *BMC Endocr Disord* 2004; 4:3.
46. Amigh, KS, Mayhew, BA, Mantero, F, Schiavi, F, White, PC, Rao, CV, Rainey, WE. Elevated expression of luteinizing hormone receptor in aldosterone-producing adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2005.
47. Mazzuco, TL, Chabre, O, Feige, JJ, Thomas, M. Aberrant GPCR expression is a sufficient genetic event to trigger adrenocortical tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 265-266:23-8.
48. Kirschner, MA, Powell, RD, Jr., Lipsett, MB. Cushing's Syndrome: Nodular Cortical Hyperplasia of Adrenal Glands with Clinical and Pathological Features Suggesting Adrenocortical Tumor. *J Clin Endocrinol Metab* 1964; 24:947-55.

49. Stratakis, CA, Kirschner, LS. Clinical and genetic analysis of primary bilateral adrenal diseases (micro- and macronodular disease) leading to Cushing syndrome. *Horm Metab Res* 1998; 30:456-63.
50. Findlay, JC, Sheeler, LR, Engeland, WC, Aron, DC. Familial adrenocorticotropin-independent Cushing's syndrome with bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:189-91.
51. Minami, S, Sugihara, H, Sato, J, Tatsukuchi, A, Sugisaki, Y, Sasano, H, Wakabayashi, I. ACTH independent Cushing's syndrome occurring in siblings. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996; 44:483-8.
52. Nies, C, Bartsch, DK, Ehlenz, K, Wild, A, Langer, P, Fleischhacker, S, Rothmund, M. Familial ACTH-independent Cushing's syndrome with bilateral macronodular adrenal hyperplasia clinically affecting only female family members. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2002; 110:277-83.
53. Miyamura, N, Taguchi, T, Murata, Y, Taketa, K, Iwashita, S, Matsumoto, K, Nishikawa, T, Toyonaga, T, Sakakida, M, Araki, E. Inherited adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia with abnormal cortisol secretion by vasopressin and catecholamines: detection of the aberrant hormone receptors on adrenal gland. *Endocrine* 2002; 19:319-26.
54. Bourdeau, I, Stratakis, CA. Cyclic AMP-dependent signaling aberrations in macronodular adrenal disease. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 968:240-55.
55. Matsukura, SK, T.Sucoka, S. Yoshimi, H. Hirata, Y. Yokota, M. Fujita, T. Multiple hormone receptor in the adenylate Cyclase of human adrenocortical tumors. *Cancer Res* 1980; 40:3768-3771.

56. Lamberts, SW, Zuiderwijk, J, Uitterlinden, P, Blijd, JJ, Bruining, HA, de Jong, FH. Characterization of adrenal autonomy in Cushing's syndrome: a comparison between in vivo and in vitro responsiveness of the adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70:192-9.
57. Aiba, M, Hirayama, A, Iri, H, Ito, Y, Fujimoto, Y, Mabuchi, G, Murai, M, Tazaki, H, Maruyama, H, Saruta, T, et al. Adrenocorticotrophic hormone-independent bilateral adrenocortical macronodular hyperplasia as a distinct subtype of Cushing's syndrome. Enzyme histochemical and ultrastructural study of four cases with a review of the literature. *Am J Clin Pathol* 1991; 96:334-40.
58. Sasano, H, Suzuki, T, Nagura, H. ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia: immunohistochemical and in situ hybridization studies of steroidogenic enzymes. *Mod Pathol* 1994; 7:215-9.
59. Doppman, JL, Chrousos, GP, Papanicolaou, DA, Stratakis, CA, Alexander, HR, Nieman, LK. Adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia: an uncommon cause of primary adrenal hypercortisolism. *Radiology* 2000; 216:797-802.
60. Fragoso, MC, Domenice, S, Latronico, AC, Martin, RM, Pereira, MA, Zerbini, MC, Lucon, AM, Mendonca, BB. Cushing's syndrome secondary to adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia due to activating mutations of GNAS1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2147-51.
62. Bourdeau, I, Matyakhina, L, Stergiopoulos, SG, Sandrini, F, Boikos, S, Stratakis, CA. 17q22-24 chromosomal losses and alterations of protein kinase a subunit expression and activity in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:3626-32.

63. Lacroix, A, Bolte, E, Tremblay, J, Dupre, J, Poitras, P, Fournier, H, Garon, J, Garrel, D, Bayard, F, Taillefer, R, et al. Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion--a new cause of Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 1992; 327:974-80.
64. Lacroix, A, Tremblay, J, Rousseau, G, Bouvier, M, Hamet, P. Propranolol therapy for ectopic beta-adrenergic receptors in adrenal Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 1997; 337:1429-34.
65. Mircescu, H, Jilwan, J, N'Diaye, N, Bourdeau, I, Tremblay, J, Hamet, P, Lacroix, A. Are ectopic or abnormal membrane hormone receptors frequently present in adrenal Cushing's syndrome? *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:3531-6.
66. Bertherat, J, Contesse, V, Louiset, E, Barrande, G, Duparc, C, Groussin, L, Emy, P, Bertagna, X, Kuhn, JM, Vaudry, H, Lefebvre, H. In vivo and in vitro screening for illegitimate receptors in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome: identification of two cases of gonadotropin/gastric inhibitory polypeptide-dependent hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:1302-10.
67. Lacroix, A, Hamet, P, Boutin, JM. Leuprolide acetate therapy in luteinizing hormone--dependent Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 1999; 341:1577-81.
68. Cartier, D, Lihmann, I, Parmentier, F, Bastard, C, Bertherat, J, Caron, P, Kuhn, JM, Lacroix, A, Tabarin, A, Young, J, Vaudry, H, Lefebvre, H. Overexpression of serotonin₄ receptors in cisapride-responsive adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal

- hyperplasia causing Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:248-54.
69. Mune, T, Murase, H, Yamakita, N, Fukuda, T, Murayama, M, Miura, A, Suwa, T, Hanafusa, J, Daido, H, Morita, H, Yasuda, K. Eutopic overexpression of vasopressin v1a receptor in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:5706-13.
70. Lacroix, AM, H. Hammet, P. Clinical evaluation of the presence of abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *The Endocrinologist* 1999:9-15.
71. Bourdeau, I, D'Amour, P, Hamet, P, Boutin, JM, Lacroix, A. Aberrant membrane hormone receptors in incidentally discovered bilateral macronodular adrenal hyperplasia with subclinical Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:5534-40.
72. Bourdeau, I, Antonini, SR, Lacroix, A, Kirschner, LS, Matyakhina, L, Lorang, D, Libutti, SK, Stratakis, CA. Gene array analysis of macronodular adrenal hyperplasia confirms clinical heterogeneity and identifies several candidate genes as molecular mediators. *Oncogene* 2004; 23:1575-85.
73. Lampron, A, Bourdeau, I, Hamet, P, Tremblay, J, Lacroix, A. Whole genome expression profiling of glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP)- and adrenocorticotropin-dependent adrenal hyperplasias reveals novel targets for the study of GIP-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:3611-8.

74. Kirschner, LS, Taymans, SE, Stratakis, CA. Characterization of the adrenal gland pathology of Carney complex, and molecular genetics of the disease. *Endocr Res* 1998; 24:863-4.
75. Stratakis, CA, Kirschner, LS, Carney, JA. Clinical and molecular features of the Carney complex: diagnostic criteria and recommendations for patient evaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4041-6.
76. Stratakis, CA. Genetics of adrenocortical tumors: Carney complex. *Ann Endocrinol (Paris)* 2001; 62:180-4.
77. Kirschner, LS, Carney, JA, Pack, SD, Taymans, SE, Giatzakis, C, Cho, YS, Cho-Chung, YS, Stratakis, CA. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat Genet* 2000; 26:89-92.
78. Groussin, L, Jullian, E, Perlemoine, K, Louvel, A, Leheup, B, Luton, JP, Bertagna, X, Bertherat, J. Mutations of the PRKAR1A gene in Cushing's syndrome due to sporadic primary pigmented nodular adrenocortical disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:4324-9.
79. Bossis, I, Voutetakis, A, Bei, T, Sandrini, F, Griffin, KJ, Stratakis, CA. Protein kinase A and its role in human neoplasia: the Carney complex paradigm. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11:265-80.
80. Knudson, AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68:820-3.

81. Casey, M, Vaughan, CJ, He, J, Hatcher, CJ, Winter, JM, Weremowicz, S, Montgomery, K, Kucherlapati, R, Morton, CC, Basson, CT. Mutations in the protein kinase A R1alpha regulatory subunit cause familial cardiac myxomas and Carney complex. *J Clin Invest* 2000; 106:R31-8.
82. Groussin, L, Kirschner, LS, Vincent-Dejean, C, Perlemoine, K, Jullian, E, Delemer, B, Zacharieva, S, Pignatelli, D, Carney, JA, Luton, JP, Bertagna, X, Stratakis, CA, Bertherat, J. Molecular analysis of the cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) regulatory subunit 1A (PRKAR1A) gene in patients with Carney complex and primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) reveals novel mutations and clues for pathophysiology: augmented PKA signaling is associated with adrenal tumorigenesis in PPNAD. *Am J Hum Genet* 2002; 71:1433-42.
83. Gunther, DF, Bourdeau, I, Matyakhina, L, Cassarino, D, Kleiner, DE, Griffin, K, Courkoutsakis, N, Abu-Asab, M, Tsokos, M, Keil, M, Carney, JA, Stratakis, CA. Cyclical Cushing syndrome presenting in infancy: an early form of primary pigmented *nodular adrenocortical disease*, or a *new entity*? *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:3173-82.
84. Kirschner, LS, Sandrini, F, Monbo, J, Lin, JP, Carney, JA, Stratakis, CA. Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKAR1A gene in patients with the carney complex. *Hum Mol Genet* 2000; 9:3037-46.
85. 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, Libe, 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; 38:794-800.

86. Brandi, ML, Gagel, RF, Angeli, A, Bilezikian, JP, Beck-Peccoz, P, Bordi, C, Conte-Devolx, B, Falchetti, A, Gheri, RG, Libroia, A, Lips, CJ, Lombardi, G, Mannelli, M, Pacini, F, Ponder, BA, Raue, F, Skogseid, B, Tamburrano, G, Thakker, RV, Thompson, NW, Tomassetti, P, Tonelli, F, Wells, SA, Jr., Marx, SJ. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:5658-71.
87. Skogseid, B, Rastad, J, Gobl, A, Larsson, C, Backlin, K, Juhlin, C, Akerstrom, G, Oberg, K. Adrenal lesion in multiple endocrine neoplasia type 1. *Surgery* 1995; 118:1077-82.
88. Pannett, AA, Thakker, RV. Multiple endocrine neoplasia type 1. *Endocr Relat Cancer* 1999; 6:449-73.
89. Beckers, A, Abs, R, Willems, PJ, van der Auwera, B, Kovacs, K, Reznik, M, Stevenaert, A. Aldosterone-secreting adrenal adenoma as part of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): loss of heterozygosity for polymorphic chromosome 11 deoxyribonucleic acid markers, including the MEN1 locus. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:564-70.
90. Langer, P, Cupisti, K, Bartsch, DK, Nies, C, Goretzki, PE, Rothmund, M, Roher, HD. Adrenal involvement in multiple endocrine neoplasia type 1. *World J Surg* 2002; 26:891-6.
91. Burgess, JR, Harle, RA, Tucker, P, Parameswaran, V, Davies, P, Greenaway, TM, Shepherd, JJ. Adrenal lesions in a large kindred with multiple endocrine neoplasia type 1. *Arch Surg* 1996; 131:699-702.

92. Lemmens, I, Van de Ven, WJ, Kas, K, Zhang, CX, Giraud, S, Wautot, V, Buisson, N, De Witte, K, Salandre, J, Lenoir, G, Pugeat, M, Calender, A, Parente, F, Quincey, D, Gaudray, P, De Wit, MJ, Lips, CJ, Hoppener, JW, Khodaei, S, Grant, AL, Weber, G, Kytola, S, Teh, BT, Farnebo, F, Thakker, RV, et al. Identification of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. The European Consortium on MEN1. *Hum Mol Genet* 1997; 6:1177-83.
93. Chandrasekharappa, SC, Teh, BT. Functional studies of the MEN1 gene. *J Intern Med* 2003; 253:606-15.
94. Pellegata, NS, Quintanilla-Martinez, L, Siggelkow, H, Samson, E, Bink, K, Hofler, H, Fend, F, Graw, J, Atkinson, MJ. Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:15558-63.
95. Marx, S, Spiegel, AM, Skarulis, MC, Doppman, JL, Collins, FS, Liotta, LA. Multiple endocrine neoplasia type 1: clinical and genetic topics. *Ann Intern Med* 1998; 129:484-94.
96. Agarwal, SK, Lee Burns, A, Sukhodolets, KE, Kennedy, PA, Obungu, VH, Hickman, AB, Mullendore, ME, Whitten, I, Skarulis, MC, Simonds, WF, Mateo, C, Crabtree, JS, Scacheri, PC, Ji, Y, Novotny, EA, Garrett-Beal, L, Ward, JM, Libutti, SK, Richard Alexander, H, Cerrato, A, Parisi, MJ, Santa Anna, AS, Oliver, B, Chandrasekharappa, SC, Collins, FS, Spiegel, AM, Marx, SJ. Molecular pathology of the MEN1 gene. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1014:189-98.
97. Skogseid, B, Larsson, C, Lindgren, PG, Kvanta, E, Rastad, J, Theodorsson, E, Wide, L, Wilander, E, Oberg, K. Clinical and genetic features of adrenocortical lesions in multiple endocrine neoplasia type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:76-81.

98. Chakrabarti, R, Srivatsan, ES, Wood, TF, Eubanks, PJ, Ebrahimi, SA, Gatti, RA, Passaro, E, Jr., Sawicki, MP. Deletion mapping of endocrine tumors localizes a second tumor suppressor gene on chromosome band 11q13. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 22:130-7.
99. Pannett, AA, Thakker, RV. Somatic mutations in MEN type 1 tumors, consistent with the Knudson "two-hit" hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4371-4.
100. Schorr, I, Ney, RL. Abnormal hormone responses of an adrenocortical cancer adenyl cyclase. *J Clin Invest* 1971; 50:1295-300.
101. Schorr, I, Rathnam, P, Saxena, BB, Ney, RL. Multiple specific hormone receptors in the adenylate cyclase of an adrenocortical carcinoma. *J Biol Chem* 1971; 246:5806-11.
102. Taunton, OD, Roth, J, Pastan, I. Studies on the adrenocorticotrophic hormone-activated adenyl cyclase of a functional adrenal tumor. *J Biol Chem* 1969; 244:247-53.
103. Perchellet, JP, Sharma, RK. Ectopic alpha-adrenergic mediated accumulation of guanosine 3',5'-monophosphate in isolated adrenocortical carcinoma cells. *Endocrinology* 1980; 106:1589-93.
104. Shanker, G, Sharma, RK. Characterization of ectopic alpha-adrenergic binding receptors of adrenocortical carcinoma cells. *Endocrinology* 1980; 106:1594-8.
105. Katz, MS, Kelly, TM, Dax, EM, Pineyro, MA, Partilla, JS, Gregerman, RI. Ectopic beta-adrenergic receptors coupled to adenylate cyclase in human adrenocortical carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60:900-9.

106. Hamet, P, Larochelle, P, Franks, DJ, Cartier, P, Bolte, E. Cushing syndrome with food-dependent periodic hormonogenesis. *Clin Invest Med* 1987; 10:530-3.
107. Reznik, Y, Allali-Zerah, V, Chayvialle, JA, Leroyer, R, Leymarie, P, Travert, G, Lebrethon, MC, Budi, I, Balliere, AM, Mahoudeau, J. Food-dependent Cushing's syndrome mediated by aberrant adrenal sensitivity to gastric inhibitory polypeptide. *N Engl J Med* 1992; 327:981-6.
108. Rosenberg, CL, Kim, HG, Shows, TB, Kronenberg, HM, Arnold, A. Rearrangement and overexpression of D11S287E, a candidate oncogene on chromosome 11q13 in benign parathyroid tumors. *Oncogene* 1991; 6:449-53.
109. 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; 355:262-5.
110. Rabes, HM, Demidchik, EP, Sidorow, JD, Lengfelder, E, Beimfohr, C, Hoelzel, D, Klugbauer, S. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2000; 6:1093-103.
111. Salassidis, K, Bruch, J, Zitzelsberger, H, Lengfelder, E, Kellerer, AM, Bauchinger, M. Translocation t(10;14)(q11.2;q22.1) fusing the kintin to the RET gene creates a novel rearranged form (PTC8) of the RET proto-oncogene in radiation-induced childhood papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2000; 60:2786-9.

112. Antonini, SR, N'Diaye, N, Hamet, P, Tremblay, J, Lacroix, A. Analysis of the putative promoter region of the GIP receptor gene (GIPR) in GIP-dependent Cushing's syndrome (CS). *Endocr Res* 2002; 28:755-6.
113. Antonini, SR, N'Diaye, N, Baldacchino, V, Hamet, P, Tremblay, J, Lacroix, A. Analysis of the putative regulatory region of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene in food-dependent Cushing's syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 91:171-7.
114. Brown, JC, Mutt, V, Pederson, RA. Further purification of a polypeptide demonstrating enterogastrone activity. *J Physiol* 1970; 209:57-64.
115. Yamada, Y, Hayami, T, Nakamura, K, Kaisaki, PJ, Someya, Y, Wang, CZ, Seino, S, Seino, Y. Human gastric inhibitory polypeptide receptor: cloning of the gene (GIPR) and cDNA. *Genomics* 1995; 29:773-6.
116. Stoffel, M, Fernald, AA, Le Beau, MM, Bell, GI. Assignment of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene (GIPR) to chromosome bands 19q13.2-q13.3 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1995; 28:607-9.
117. Usdin, TB, Mezey, E, Button, DC, Brownstein, MJ, Bonner, TI. Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology* 1993; 133:2861-70.
118. Chabre, O, Liakos, P, Vivier, J, Chaffanjon, P, Labat-Moleur, F, Martinie, M, Bottari, SP, Bachelot, I, Chambaz, EM, Defaye, G, Feige, JJ. Cushing's syndrome due to a gastric inhibitory polypeptide-dependent adrenal adenoma: insights into hormonal control of adrenocortical tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3134-43.

119. Lebrethon, MC, Avallet, O, Reznik, Y, Archambeaud, F, Combes, J, Usdin, TB, Narboni, G, Mahoudeau, J, Saez, JM. Food-dependent Cushing's syndrome: characterization and functional role of gastric inhibitory polypeptide receptor in the adrenals of three patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:4514-9.
120. Luton, JP, Bertherat, J, Kuhn, JM, Bertagna, X. [Aberrant expression of the GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide) receptor in an adrenal cortical adenoma responsible for a case of food-dependent Cushing's syndrome]. *Bull Acad Natl Med* 1998; 182:1839-49; discussion 1849-50.
121. N'Diaye, N, Hamet, P, Tremblay, J, Boutin, JM, Gaboury, L, Lacroix, A. Asynchronous development of bilateral nodular adrenal hyperplasia in gastric inhibitory polypeptide-dependent cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:2616-22.
122. N'Diaye, N, Tremblay, J, Hamet, P, De Herder, WW, Lacroix, A. Adrenocortical overexpression of gastric inhibitory polypeptide receptor underlies food-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:2781-5.
123. Herder, WW, Hofland, LJ, Usdin, TB, de Jong, FH, Uitterlinden, P, van Koetsveld, P, Mezey, E, Bonner, TI, Bonjer, HJ, Lamberts, SW. Food-dependent Cushing's syndrome resulting from abundant expression of gastric inhibitory polypeptide receptors in adrenal adenoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3168-72.
124. Groussin, L, Perlemoine, K, Contesse, V, Lefebvre, H, Tabarin, A, Thieblot, P, Schlienger, JL, Luton, JP, Bertagna, X, Bertherat, J. The ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor is frequent in adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia, but rare in unilateral tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1980-5.

125. Noordam, C, Hermus, AR, Pesman, G, N'Diaye, N, Sweep, CG, Lacroix, A, Otten, BJ. An adolescent with food-dependent Cushing's syndrome secondary to ectopic expression of GIP receptor in unilateral adrenal adenoma. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002; 15:853-60.
126. Swords, FM, Aylwin, S, Perry, L, Arola, J, Grossman, AB, Monson, JP, Clark, AJ. The aberrant expression of the gastric inhibitory polypeptide (GIP) receptor in adrenal hyperplasia: does chronic ACTH exposure stimulate up-regulation of GIP receptors in Cushing's disease? *J Clin Endocrinol Metab* 2005.
127. Tsagarakis, S, Tsigos, C, Vassiliou, V, Tsiotra, P, Pratsinis, H, Kletsas, D, Trivizas, P, Nikou, A, Mavromatis, T, Sotsiou, F, Raptis, S, Thalassinou, N. Food-dependent androgen and cortisol secretion by a gastric inhibitory polypeptide-receptor expressive adrenocortical adenoma leading to hirsutism and subclinical Cushing's syndrome: in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:583-9.
128. Ascoli, M, Fanelli, F, Segaloff, DL. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev* 2002; 23:141-74.
129. Reshef, E, Lei, ZM, Rao, CV, Pridham, DD, Chegini, N, Luborsky, JL. The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70:421-30.
130. Pabon, JE, Li, X, Lei, ZM, Sanfilippo, JS, Yussman, MA, Rao, CV. Novel presence of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human adrenal glands. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:2397-400.

131. Yared, ZBI, Lacroix A. Failure to control Cushing's syndrome with leuprolide acetate in a case of ACTH-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia with partial regulation of cortisol secretion by LH and hCG, *The Endocrine Society 84th Meeting*, San Francisco, CA, 2002.
132. Goodarzi, MO, Dawson, DW, Li, X, Lei, Z, Shintaku, P, Rao, CV, Van Herle, AJ. Virilization in bilateral macronodular adrenal hyperplasia controlled by luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:73-7.
133. Feelders, RA, Lamberts, SW, Hofland, LJ, van Koetsveld, PM, Verhoef-Post, M, Themmen, AP, de Jong, FH, Bonjer, HJ, Clark, AJ, van der Lely, AJ, de Herder, WW. Luteinizing hormone (LH)-responsive Cushing's syndrome: the demonstration of LH receptor messenger ribonucleic acid in hyperplastic adrenal cells, which respond to chorionic gonadotropin and serotonin agonists in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:230-7.
134. Wy, LA, Carlson, HE, Kane, P, Li, X, Lei, ZM, Rao, CV. Pregnancy-associated Cushing's syndrome secondary to a luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor-positive adrenal carcinoma. *Gynecol Endocrinol* 2002; 16:413-7.
135. Werk, EE, Jr., Sholiton, LE, Kalejs, L. Testosterone-secreting adrenal adenoma under gonadotropin control. *N Engl J Med* 1973; 289:767-70.
136. Givens, JR, Andersen, RN, Wiser, WL, Coleman, SA, Fish, SA. A gonadotropin-responsive adrenocortical adenoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 38:126-33.
137. Faggiano, M, Criscuolo, T, Sinisi, AA, Scialdone, A, Bellastella, A, Cuccurullo, L. Virilization syndrome in a young woman due to an androgen-secreting adenoma. *J Endocrinol Invest* 1984; 7:41-5.

138. Guillausseau, PJ, Boitard, C, Le Charpentier, Y, Cedard, L, Nahoul, K, Blacker, C, Kaloustian, E, Courtalzac-Kaloustian, F, Dubost, C, Lubetzki, J. Androgen producing adrenal adenoma. Report on a case associated with hyperparathyroidism. *J Endocrinol Invest* 1987; 10:593-9.
139. Loszio, FA, Toth, S, Kocsis, J, Pavo, Szecsi, M. Testosterone-secreting gonadotropin-responsive adrenal adenoma and its treatment with the antiandrogen flutamide. *J Endocrinol Invest* 2001; 24:622-7.
140. Sullivan, M, Boileau, M, Hodges, CV. Adrenal cortical carcinoma. *J Urol* 1978; 120:660-5.
141. Macfarlane, DA. Cancer of the adrenal cortex; the natural history, prognosis and treatment in a study of fifty-five cases. *Ann R Coll Surg Engl* 1958; 23:155-86.
142. Miller, SA, Dykes, DD, Polesky, HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
143. Rupp, GM, Locker, J. Purification and analysis of RNA from paraffin-embedded tissues. *Biotechniques* 1988; 6:56-60.
144. 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; 25:402-8.
145. Cupisti, K, Hoppner, W, Dotzenrath, C, Simon, D, Berndt, I, Roher, HD, Goretzki, PE. Lack of MEN1 gene mutations in 27 sporadic insulinomas. *Eur J Clin Invest* 2000; 30:325-9.

146. Hanahan, D, Weinberg, RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.
147. Mazzuco, TL, Chabre, O, Feige, JJ, Thomas, M. Aberrant expression of human luteinizing hormone receptor by adrenocortical cells is sufficient to provoke both hyperplasia and Cushing's syndrome features. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:196-203.
148. Mazzuco, TL, Chabre, O, Sturm, N, Feige, JJ, Thomas, M. Ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene is a sufficient genetic event to induce benign adrenocortical tumor in a xenotransplantation model. *Endocrinology* 2006; 147:782-90.
149. Bourdeau, I, Lacroix, A, Schurch, W, Caron, P, Antakly, T, Stratakis, CA. Primary pigmented nodular adrenocortical disease: paradoxical responses of cortisol secretion to dexamethasone occur in vitro and are associated with increased expression of the glucocorticoid receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:3931-7.
150. Chandrasekharappa, SC, Guru, SC, Manickam, P, Olufemi, SE, Collins, FS, Emmert-Buck, MR, Debelenko, LV, Zhuang, Z, Lubensky, IA, Liotta, LA, Crabtree, JS, Wang, Y, Roe, BA, Weisemann, J, Boguski, MS, Agarwal, SK, Kester, MB, Kim, YS, Heppner, C, Dong, Q, Spiegel, AM, Burns, AL, Marx, SJ. Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science* 1997; 276:404-7.
151. Mikola, M, Kero, J, Nilson, JH, Keri, RA, Poutanen, M, Huhtaniemi, I. High levels of luteinizing hormone analog stimulate gonadal and adrenal tumorigenesis in mice transgenic for the mouse inhibin-alpha-subunit promoter/Simian virus 40 T-antigen fusion gene. *Oncogene* 2003; 22:3269-78.

152. Matzuk, MM, Finegold, MJ, Mather, JP, Krummen, L, Lu, H, Bradley, A. Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:8817-21.
153. Matzuk, MM, Finegold, MJ, Su, JG, Hsueh, AJ, Bradley, A. Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* 1992; 360:313-9.
154. Mann, RJ, Keri, RA, Nilson, JH. Consequences of elevated luteinizing hormone on diverse physiological systems: use of the LHbetaCTP transgenic mouse as a model of ovarian hyperstimulation-induced pathophysiology. *Recent Prog Horm Res* 2003; 58:343-75.
155. Kero, J, Poutanen, M, Zhang, FP, Rahman, N, McNicol, AM, Nilson, JH, Keri, RA, Huhtaniemi, IT. Elevated luteinizing hormone induces expression of its receptor and promotes steroidogenesis in the adrenal cortex. *J Clin Invest* 2000; 105:633-41.
156. Bielinska, M, Kiiveri, S, Parviainen, H, Mannisto, S, Heikinheimo, M, Wilson, DB. Gonadectomy-induced adrenocortical neoplasia in the domestic ferret (*Mustela putorius furo*) and laboratory mouse. *Vet Pathol* 2006; 43:97-117.
157. Coulter, CL. Fetal adrenal development: insight gained from adrenal tumors. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16:235-42.
158. Abdallah, MA, Lei, ZM, Li, X, Greenwold, N, Nakajima, ST, Jauniaux, E, Rao Ch, V. Human fetal nongonadal tissues contain human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:952-6.

159. Ehses, JA, Casilla, VR, Doty, T, Pospisilik, JA, Winter, KD, Demuth, HU, Pederson, RA, McIntosh, CH. Glucose-dependent insulintropic polypeptide promotes beta-(INS-1) cell survival via cyclic adenosine monophosphate-mediated caspase-3 inhibition and regulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 2003; 144:4433-45.
160. Friedrichsen, BN, Neubauer, N, Lee, YC, Gram, VK, Blume, N, Petersen, JS, Nielsen, JH, Moldrup, A. Stimulation of pancreatic beta-cell replication by incretins involves transcriptional induction of cyclin D1 via multiple signalling pathways. *J Endocrinol* 2006; 188:481-92.
161. Holst, JJ. Glucagon-like peptide-1, a gastrointestinal hormone with a pharmaceutical potential. *Curr Med Chem* 1999; 6:1005-17.
162. Kubota, A, Yamada, Y, Yasuda, K, Someya, Y, Ihara, Y, Kagimoto, S, Watanabe, R, Kuroe, A, Ishida, H, Seino, Y. Gastric inhibitory polypeptide activates MAP kinase through the wortmannin-sensitive and -insensitive pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 235:171-5.
163. Huang, E, Cheng, SH, Dressman, H, Pittman, J, Tsou, MH, Horng, CF, Bild, A, Iversen, ES, Liao, M, Chen, CM, West, M, Nevins, JR, Huang, AT. Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *Lancet* 2003; 361:1590-6.
164. Mannelli, M, Ferruzzi, P, Luciani, P, Crescioli, C, Buci, L, Corona, G, Serio, M, Peri, A. Cushing's syndrome in a patient with bilateral macronodular adrenal hyperplasia responding to cisapride: an in vivo and in vitro study. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:4616-22.

165. Morelli, A, Falchetti, A, Martinetti, V, Becherini, L, Mark, M, Friedman, E, Brandi, ML. MEN1 gene mutation analysis in Italian patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Eur J Endocrinol* 2000; 142:131-7.
166. Agarwal, SK, Kester, MB, Debelenko, LV, Heppner, C, Emmert-Buck, MR, Skarulis, MC, Doppman, JL, Kim, YS, Lubensky, IA, Zhuang, Z, Green, JS, Guru, SC, Manickam, P, Olufemi, SE, Liotta, LA, Chandrasekharappa, SC, Collins, FS, Spiegel, AM, Burns, AL, Marx, SJ. Germline mutations of the MEN1 gene in familial multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. *Hum Mol Genet* 1997; 6:1169-75.
167. Lampron A; Martin M, BI, Lacroix A. Aberrant Regulation of Aldosterone Secretion Mediated by Several Receptors including for GIP in an Aldosterone Producing Adenoma, XII Adrenal Cortex and V Molecular Steroidogenesis Conference. *Abstract* 45- p.49, Boston, USA, 2006.