Universidade de São Paulo

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais

ISADORA PONTES CAVALCANTE

Caracterização de culturas de células de hiperplasia macronodular adrenal primária (PMAH) como modelo biológico para estudo funcional do gene *ARMC5*

São Paulo

2018

ISADORA PONTES CAVALCANTE

Caracterização de culturas de células de hiperplasia macronodular adrenal primária (PMAH) como modelo biológico para estudo funcional do gene *ARMC5*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Prof. Dra. Maria Candida BV Fragoso[1]

Co-orientadora: Prof. Dra. Claudimara FP Lotfi[2]

Instituições:

[1] Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, Divisão de Endocrinologia e Metabolismo – Unidade de Suprarrenal – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP)

[2] Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Pontes Cavalcante, Isadora
Caracterização de culturas de células de hiperplasia macronodular adrenal primária (PMAH) como modelo biológico para estudo funcional do gene ARMC5 / Isadora Pontes Cavalcante; orientador Maria Candida Barisson Villares Fragoso; coorientador Claudimara Ferini Pacicco Lotfi. -- São Paulo, 2018.
107 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Síndrome de Cushing. 2. PMAH. 3. ARMC5. 4. Culturas de células . I. Barisson Villares Fragoso, Maria Candida , orientador. II. Ferini Pacicco Lotfi, Claudimara, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Isadora Pontes Cavalcante

Título da Dissertação/Tese: Caracterização de culturas de células de hiperplasia macronodular adrenal primária (PMAH) como modelo biológico para estudo funcional do gene *ARMC5*

Orientador: Maria Candida Barisson Villares Fragoso

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 26 de abril de 2016.

PARECER 1288/CEPSH
CAAE nº 49449815.7.0000.5467

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, APROVOU o projeto intitulado: "***Caracterização morfofuncional de células de hiperplasia macronodular adrenal: a importância da mutação do gene Armadillo Repeat Containing 5 (ARMC5)***" dos pesquisadores Profa. Dra. **Claudimara Ferini Pacicco Lotfi** e da aluna **Isadora Pontes Cavalcante**.

Cabe aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: www.icb.usp.br, como também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **26/04/2017**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Prof. Dr. **PAOLO MARINHO ANDRADE ZANOTTO**
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio e amor incondicionais

Às Dras. Maria Candida Fragoso e Claudimara Lotfi, pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos e pela paciência ao longo destes anos. O incentivo de vocês foi imprescindível para a realização deste projeto.

Aos meus amigos de laboratório, pelo apoio e união, que tornaram esta caminhada mais leve e divertida

À Dra. Mirian Nishi, pelo sequenciamento do gene *ARMC5*

Aos Drs. Jérôme Bertherat, Bruno Ragazzon e Marthe Rizk-Rabin, pelo acolhimento e suporte durante a minha estadia no Instituto Cochin

À Dra. Cintia Fridman, pela realização do DNA *fingerprint* das culturas celulares

Às Dras. Maria Luiza Morais Barreto de Chaves, Katiucia Paiva e Marilene Lopes, componentes da minha banca qualificação, pelas valiosas sugestões

À Maria Aparecida Medeiros e Senária Eguti, pela ajuda no gerenciamento do projeto

Ao CEFAP – ICB (USP), pela utilização do *InCell Analyser* e do citômetro de fluxo

Ao Departamento de Anatomia e ao Instituto de Ciências Biomédicas

À Capes e à FAPESP, pelo suporte financeiro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia da peça cirúrgica retirada de paciente com PMAH e síndrome de Cushing clássica e fotomicrografia de uma secção do tecido de uma hiperplasia adrenal macronodular corada com hematoxilna e eosina. 16
Figura 2 – Figura representativa da provável origem do ACTH intra-adrenal presente nas células de PMAH. 20
Figura 3 – Regulação anormal do córtex adrenal regulado por receptores aberrantes, ACTH ectópico e mutações no gene ARMC5 22
Figura 4 – Representação da estrutura do gene *ARMC5,* com seus éxons e domínios responsáveis pelas interações proteína-proteína. 24
Figura 5 – Concentrações de cortisol e ACTH em pacientes carreadores ou não de mutações no gene ARMC5. 48
Figura 6 - Fotomicrografia representativa das culturas de células de adrenal normal e das culturas de PMAH utilizadas neste estudo. 49
Figura 7 - Fotomicrografia representativa das culturas utilizadas, demonstrando a presença de gotículas lipídicas no citoplasma das células 50
Figura 8 - Eletroferograma representativo de mutação encontrada no material extraído de sangue e da cultura de células de um paciente 51
Figura 9 – Expressão do mRNA dos genes ARMC5, 3BHSD2 e CYP17A1 no pool de adrenal normal, na linhagem H295R e nas culturas de células de PMAH. 54
Figura 10 – Localização e expressão da proteína ARMC5 em células de adrenal normal, na linhagem H295R e em culturas de células de PMAH, com ou sem mutações no gene *ARMC5* 55
Figura 11 - Expressão relativa do mRNA dos genes *AVP1aR, AVP2R, 5HT4R* e *GIPR* no pool de adrenal normal, na linhagem H295R e nas culturas de células de PMAH. 56
Figura 12 - Expressão relativa do mRNA do gene *POMC* e *MC2R* no pool de adrenal normal, na linhagem H295R e nas culturas de células de PMAH. 58
Figura 13 – Expressão do mRNA do gene *PCSK1* no pool de adrenal total e em culturas de células de PMAH; Fotomicrografia representativa da expressão proteica de ACTH intra-adrenal nas culturas de células de PMAH. 59
Figura 14 - Efeitos da Forskolina, da Vasopressina, do ACTH e do H89 em culturas de células de PMAH 61
Figura 15 – Efeitos na produção do ACTH ectópico ao tratamento com ACTH em uma cultura de células de PMAH. 62
Figura 16 - Validação do silenciamento do ARMC5 na linhagem de células HEK293T 63

Figura 17 - Efeitos do silenciamento do ARMC5 na esteroidogênese na linhagem de células H295R.....64
Figura 18 - Silenciamento do ARMC5 em cultura de células de PMAH. 66
Figura 19 - Efeitos do silenciamento do ARMC5 na na esteroidogênese em cultura de células de PMAH 67
Figura 20 - Efeitos do silenciamento do ARMC5 na viabilidade e proliferação na linhagem H295R e na cultura de células de PMAH 69
Figura 21 - Análise por citometria de fluxo da quantidade de DNA em células de PMAH ARMC5 silenciadas e controle. 71
Figura 22 - Quantificação da intensidade do corante de DNA em células ARMC5-silenciadas e controle, e fotomicrografia das células analisadas.....71
Figura 23 - Efeitos da hiperexpressão do ARMC5 na esteroidogênese na linhagem H295R. 73
Figura 24 - Efeitos da hiperexpressão do ARMC5 na esteroidogênese em cultura de células de PMAH carreadora de mutação no gene ARMC5.....74
Figura 25 - Efeitos da hiperexpressão do ARMC5 na esteroidogênese em cultura de células de PMAH não carreadora de mutação do gene ARMC5 75
Figura 26 - Efeitos do ARMC5 na viabilidade celular em cultura de células de PMAH através de *live cell imaging..* 76
Figura 27 - Efeitos na viabilidade celular através da hiperexpressão do ARMC5 na linhagem H295R e nas culturas de células de PMAH 77
Figura 28 - Representação dos genes regulados após hiperexpressão do *ARMC5* em culturas de células de PMAH. 79
Figura 29 - Expressão relativa do gene *ARMC5* em células transduzidas com o controle e com a sequência guia A3 para o gene *ARMC5.* 80
Figura 30 - Curva de crescimento de células transduzidas com o controle e com a sequência A3 para o gene *ARMC5.*.....81
Figura 31 - Ensaio MTS de células transduzidas com o controle e com a sequência A3 para o gene *ARMC5.* 81
Figura 32 – Resumo dos resultados deste estudo sobre a regulação do córtex adrenal de células provenientes de nódulos de PMAH. 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados clínicos dos pacientes com PMAH.....29

Tabela 2 - *Primers* utilizados para sequenciamento do gene *ARMC5.* 35

Tabela 3 - Sequências dos *primers* utilizados para as reações de qPCR. 36

Tabela 4 - Sequências dos guias utilizados para shRNA. 40

Tabela 5 - Mutações encontradas no DNA extraído das culturas de células de PMAH, do tecido adrenal dos pacientes e do sangue periférico. 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3β-HSD2	3β-hidroxiesteroide desidrogenase do tipo 2
5HT4R	Receptor de serotonina do tipo 4
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ARMC5	*Armadillo repeat containing 5*
ARMC8	*Armadillo repeat containing 8*
AVP	Vasopressina
AVPR1a	Receptor de vasopressina do tipo 1a
AVPR2	Receptor de vasopressina do tipo 2
BMAH	Hiperplasia macronodular adrenal bilateral
CCNE1	Ciclina E1
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
CT	C*ycle threshold*
CTNNB1	Beta catenina
CYP11A1	*Cytochrome P450 Family 11 Subfamily A Member 1*
CYP17A1	*Cytochrome P450 Family 17 Subfamily A Member 1*
DAB	Diaminobenzidina
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
ECL	Reagente *enhanced chemiluminescence*
FDG	Fluordesoxiglicose
FK	Forskolina
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GIPR	Receptor do peptídeo inibitório gástrico
HK2	Hexoquinase 2

HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
ITS	Insulina transferrina selênio
LOH	Perda de heterozigose
MC2R	Receptor de melanocortina tipo 2
MTS	Ensaio colorimétrico de viabilidade/proliferação
NP40	Nonidet
PBS	Tampão salina tamponado com fosfato
PBSA	Tampão salina tamponado sem cálcio e magnésio
PCSK1	Pro-hormônio convertase do tipo 1
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PKA	Proteína quinase A
PMAH	Hiperplasia macronodular adrenal primária
PPNAD	Hiperplasia micronodular pigmentosa primária
POMC	Proopiomelanocortina
RIPA	*Radioimmunoprecipitation assay buffer*
RM	Ressonância magnética
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
SC	Síndrome de Cushing
SF1	Fator esteroidogênico 1
SFB	Soro bovino fetal
shRNA	*Short hairpin* RNA
SLC2A1	1 *solute carrier family 2 member 1/Glucose transporter 1*
STR	*Short tandem repeats*
TBST	Tampão salina Tris + Tween 20
TC	Tomografia computadorizada

SUMÁRIO

1. **Introdução**..... 12
1.1 A glândula adrenal 12
1.2 O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal..... 12
1.3 Síndrome de Cushing 13
1.4 Hiperplasia macronodular adrenal primária (PMAH)..... 16
1.5 Manifestações clínicas 17
1.6 Mecanismos moleculares envolvidos na PMAH..... 18
1.7 O gene e proteína Armadillo repeat containing 5 (*ARMC5*) 22
1.8 Justificativa..... 25
2. **Objetivos**..... 26
3. **Material e Métodos**..... 27
3.1. Pacientes 27
3.2. Culturas de células..... 30
3.3. Caracterização das culturas de células obtidas de nódulos hiperplásicos de pacientes diagnosticados com PMAH..... 30
3.4. Silenciamento do gene *ARMC5*.....39
3.5 Hiperexpressão do gene *ARMC5*.....43
3.6 Análise estatística 47
4. **Resultados**..... 47
4.1 Pacientes 47
4.2 Caracterização das culturas de células provenientes de nódulos de PMAH..... 48
4.3 Análise funcional das culturas de PMAH através da coloração por Oil Red O... 49
4.4 Sequenciamento do gene *ARMC5*..... 50
4.5 Análise da expressão dos genes *ARMC5, 3BHSD2* e *CYP17A1* nas culturas celulares..... 53
4.6 Análise da expressão de receptores ectópicos acoplados à proteína G 56
4.7 Análise da expressão de *POMC*, ACTH intra-adrenal e *MC2R* 57
4.8 Análise da resposta de células de PMAH ao ACTH, AVP e à FK 60
4.9 Estudo funcional do *ARMC5* nas culturas de PMAH..... 62
4.9.1 Silenciamento do *ARMC5* 62
4.9.2 Hiperexpressão do *ARMC5* na linhagem H295R e em culturas de células de PMAH carreadores e não carreadora de mutações 72
5. **Discussão** 82
6. **Conclusões**..... 91
7. **Referências**..... 92
8. **Anexo.**.....101

Resumo

A PMAH é uma causa rara de síndrome de Cushing, cuja real prevalência parece subestimada. O processo fisiopatológico que culminaria com a PMAH ainda não foi totalmente elucidado. A produção de cortisol mediada por receptores acoplados a proteína G (ectópicos/tópicos da adrenal) geralmente hiperexpressos, bem como a regulação autócrina/parácrina do ACTH ectópico em *clusters* celulares dos macronódulos adrenais têm sido considerados como parte importante do processo fisiopatológico da PMAH. Além destes mecanismos, recentemente, foi demonstrado a associação de variantes patogênicas germinativas/somáticas no gene *ARMC5* como uma causa frequente da PMAH. Os estudos funcionais que caracterizaram o *ARMC5* como gene supressor de tumor e potencialmente envolvido na hiperplasia adrenal nodular e sua produção de cortisol foram realizados em células H295R, derivadas de carcinoma adrenocortical. Células estas que não representam em tese um modelo ideal para o estudo de uma doença absolutamente benigna. **Objetivos:** Obtenção e caracterização morfofuncional de culturas de células obtidas de nódulos adrenais de pacientes submetidos à adrenalectomia com diagnóstico histopatológico compatível com PMAH, como um modelo biológico para a análise funcional do gene *ARMC5*. **Métodos:** Foram utilizadas 13 culturas de células de PMAH caracterizadas do ponto de vista morfofuncional e molecular para as análises funcionais do gene *ARMC5.* **Resultados:** As culturas de PMAH apresentaram mutações germinativas no *ARMC5* identificadas em 8 das 13 culturas analisadas, associadas ou não a segundos eventos moleculares. As culturas de células de PMAH apresentaram receptores eutópicos e ectópicos de uma maneira heterogênea e a presença de ACTH ectópico em clusters de células. Diante do estímulo com ACTH, uma cultura de PMAH estimulou a esteroidogênese, a transcrição de enzimas esteroidogênicas, dos genes *MC2R* e *POMC,* porém isto não ocorreu diante de estímulo com AVP. O silenciamento do *ARMC5* nas células de PMAH levou à diminuição da esteroidogênese*,* ao aumento de *CCNE1* e ao número de células viáveis após 96h. Quando hiperexpresso, o gene *ARMC5* induziu apoptose e necrose celular após 12h, diminuindo a viabilidade das células de células de PMAH. **Conclusões:** Legitimamos a importância do papel do *ARMC5* na esteroidogênese relacionada à PMAH, bem como sua função favorecendo a apoptose celular; além disso, pela primeira vez, detectamos o envolvimento do *ARMC5* na regulação do ciclo celular e proliferação, cuja importância será explorada em estudos futuros.

Summary

Background: PMAH is a rare cause of Cushing's syndrome, with an apparent underestimated prevalence. The pathophysiology of PMAH is not yet fully understood, however the participation of aberrant receptors and intra-adrenal ACTH in the hyperplastic tissue are considered mechanisms that regulate hypercortisolism in PMAH. Additionally, germline *ARMC5* mutations have been described as the most frequent genetic abnormality found in patients diagnosed with PMAH. Previous functional studies analyzed *ARMC5* role using H295R cells, a cell line of adrenocortical carcinoma. **Objectives:** In this study we investigated the role of ARMC5 in cell cultures obtained from PMAH nodules. **Results:** We observed the presence of mutations in *ARMC5* gene in 8 out of 13 PMAH cell cultures analyzed. We observed the presence of aberrant receptors and intra-adrenal ectopic ACTH, regardless the presence of mutations. ACTH, but not AVP, stimulated steroidonegesis and the transcription of steroidogenic enzymes, *MC2R* and *POMC* in a PMAH cell culture. *ARMC5* silencing in non-mutated PMAH cell cultures decreased steroidogenesis-related genes and increased *CCNE1* mRNA expression and the number of viable cells without affecting cell viability. Additionally, ARMC5 overexpression induced cell death in PMAH mutated cell cultures, thereby decreasing cell viability. **Conclusions:** We confirmed the role of ARMC5 as an important pro-apoptotic protein involved in PMAH-related steroidogenesis. We also report for the first time the possible involvement of ARMC5 in controlling proliferation and regulating cell cycle in PMAH cell cultures, which need to be further explored.

1. Introdução

1.1 A glândula adrenal

As glândulas suprarrenais estão localizadas no polo superior de cada rim e são constituídas por dois tecidos distintos com origens embrionárias diferentes; a região mais interna é a medula adrenal, responsável pela produção de catecolaminas, tais como a adrenalina e noradrenalina, e originada a partir da crista neural. Externamente à medula encontra-se o córtex adrenal, originado da mesoderme. O córtex adrenal é dividido em três zonas concêntricas, responsáveis pela produção de hormônios distintos: a zona mais externa é a glomerulosa, que secreta mineralocorticóides, sob o controle do sistema renina-angiotensina, como a aldosterona; a zona mais intermediária, a fasciculada, produz glicocorticoides, sob o controle do ACTH hipofisário, e leva à produção principalmente do cortisol em humanos e corticosterona em murinos; e a zona mais interna, a reticular, também sob estímulo do ACTH, tem como função a produção de hormônios andrógenos, como a testosterona.

1.2 O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

Os hormônios desempenham um papel importante no desenvolvimento de uma ampla gama de comportamentos e respostas do corpo humano. Mais especificamente, as glândulas suprarrenais estão envolvidas em uma variedade de processos, com o objetivo primário de manter a homeostase do organismo, como a resposta ao stress, balanço eletrolítico e metabolismo da glicose.

A regulação da produção e liberação dos glicocorticoides é feita através do eixo denominado hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). No hipotálamo, através de estímulos nervosos específicos, as células dos núcleos hipotalâmicos são estimuladas a produzir a vasopressina e o hormônio liberador de corticotropina

(CRH). O CRH, através do sistema porta-hipofisário, estimula na adeno-hipófise, mais especificamente nas células corticotróficas, a produção do peptídeo pró-opiomelanocortina (POMC), precursor do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), através da via da proteína quinase A (PKA). O ACTH, por sua vez, atua no córtex da glândula suprarrenal, ligando-se a um receptor específico, o receptor de melanocortina do tipo 2 (MC2R), que irá estimular as células adrenocorticais a produzir glicocorticoides, dentre eles o cortisol. Por outro lado, os glicocorticóides agem no hipotálamo e na hipófise, inibindo a liberação do CRH e a produção de ACTH, via retroalimentação negativa, que resulta na inibição do eixo HPA e da produção de cortisol, mantendo assim sua produção e controle fisiológico (1).

1.3 Síndrome de Cushing

Descrita pela primeira vez por Harvey Cushing em 1932 (2), a síndrome de Cushing (SC) consiste em um estado clínico resultante da exposição excessiva e crônica aos glicocorticoides (3). A SC pode ser causada pela administração exógena prolongada de glicocorticoides (SC exógena) ou por glicocorticoides secretados em excesso pelo córtex da suprarrenal (SC endógena).

Com relação à sua etiologia, a SC pode ser classificada como dependente ou independente do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH no córtex adrenal normal, tem um papel, bem estabelecido, de promover a proliferação e esteroidogênese, principalmente sobre a zona fasciculada, mediando a síntese de cortisol (4). Na síndrome de Cushing independente do ACTH hipofisário, o controle do eixo HPA através da retroalimentação negativa é perdido, e pode-se dizer que há uma autonomia da produção do cortisol independente da regulação do eixo HPA. Na população adulta, 15-20% dos casos de SC endógena são independentes de ACTH, com o predomínio das lesões unilaterais, como adenomas e carcinomas (90-

95%) (5). As lesões bilaterais são menos comuns e incluem a hiperplasia micronodular pigmentosa primária (PPNAD) e a hiperplasia adrenal macronodular primária (PMAH).

1.4 Hiperplasia macronodular adrenal primária

A hiperplasia macronodular adrenal primária (PMAH) é uma causa rara de SC, cuja real prevalência parece subestimada e variável, sendo responsável por menos de 2% de todos os casos (6). Descrita pela primeira em 1964 por Kirschner e colaboradores (7), a PMAH se caracteriza pela presença de macronódulos, geralmente comprometendo ambas as adrenais, e por uma produção variável de cortisol, o que pode levar desde um quadro de hipercortisolismo subclínico (geralmente assintomático) até a síndrome de Cushing clássica, com todos os acometimentos do hipercortisolismo. Os pacientes geralmente são diagnosticados com PMAH quando estão sob investigação da síndrome de Cushing manifesta, ou quando ocorre uma observação incidental de nódulos suprarrenais bilaterais (1% das TC/RM) em exames de imagem radiológica dirigidos para outros fins, que não doenças associadas à glândula adrenal.

Até recentemente, acreditava-se que a doença se manifestasse principalmente sob a forma de SC clássica, ao redor das 5° e 6 ° décadas de vida com discreta prevalência para o sexo feminino, no entanto, a forma subclínica parece ser a apresentação mais frequente da doença, que por sua vez é sub-diagnosticada (6). Esta constatação foi estabelecida em estudo de famílias brasileiras, onde 85% dos indivíduos apresentavam hipercortisolismo subclínico, caracterizado por ausência de supressão do cortisol após administração de 1 mg de dexametasona *overnight*, associados à discreta síndrome metabólica (8).

A PMAH é uma neoplasia benigna sem relatos na literatura de transformação maligna dessas lesões suprarrenais, mesmo após 8 anos de seguimento de pacientes sem qualquer tratamento (6). A análise macroscópica mostra, geralmente, o aumento do tamanho das adrenais, associado à presença de múltiplos nódulos de coloração amarelada que se sobressaem na superfície glandular (Figura 1A). Nas adrenais normais, o peso combinado das duas glândulas varia geralmente de 8 a 12 g, enquanto que na PMAH o peso somado das adrenais é habitualmente maior que 60 g, podendo chegar a mais de 200 g. O exame microscópico do tecido revela a presença de múltiplas regiões nodulares de aspecto homogêneo, constituídos predominantemente por dois grupos celulares distintos: um formado por células grandes de citoplasma claro, ricas em lipídios e dispostas em cordões, e o outro constituído por células pequenas de citoplasma compacto, pobres em lipídios, dispostas em estruturas semelhantes a “ilhas” (Figura 1B) (9).

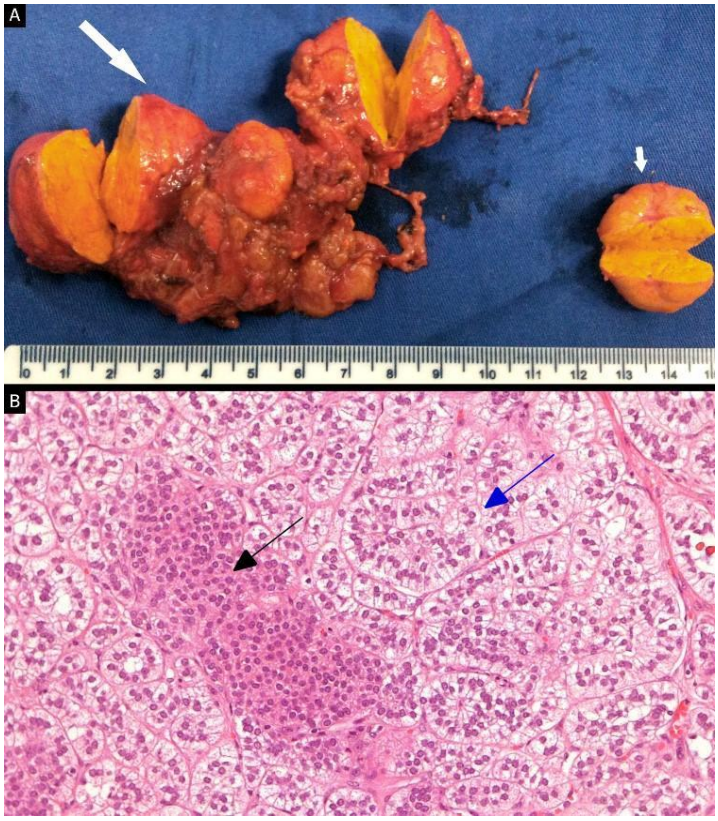

Figura 1 - Fotografia da peça cirúrgica retirada de paciente com PMAH e síndrome de Cushing clássica devido à PMAH; (A) o aumento da glândula adrenal (seta maior) e a presença de nódulos de coloração amarelada, e um dos nódulos isolado (seta menor); (B) Fotomicrografia de uma secção do tecido de uma hiperplasia adrenal macronodular corada com hematoxilina e eosina, onde observam-se células de citoplasma claro grandes (seta azul) e células de citoplasma compacto (seta preta).

Estudos que utilizaram os métodos de hibridização *in situ* e imunoistoquímica mostraram uma expressão distinta de algumas das enzimas esteroidogênicas nos tipos celulares encontrados nos nódulos estudados (10). Desta forma, foi observado que a enzima 3β-hidroxiesteroide desidrogenase do tipo 2 (3β-HSD2) encontra-se expressa exclusivamente nas células grandes, de citoplasma claro, enquanto que a enzima 17α-hidroxilase/17,20-liase (CYP17A1) encontra-se expressa sobretudo nas células pequenas de citoplasma compacto. As demais enzimas esteroidogênicas estão presentes nos dois tipos celulares, mas frequentemente apresentam uma expressão reduzida. Pelo fato de que os pacientes com PMAH apresentam geralmente uma esteroidogênese ineficiente, o hipercortisolismo parece estar

relacionado, principalmente, ao aumento do número de células adrenocorticais, e não ao aumento da esteroidogênese de cada célula individualmente (6).

1.5 Manifestações Clínicas

A PMAH ocorre com igual prevalência entre os gêneros, entretanto, tem-se observado discreta prevalência para o sexo feminino. Na maioria das vezes, torna-se clinicamente manifesta por volta da quinta a sexta décadas de vida, em contraposição à maioria das causas de síndrome de Cushing, que apresenta predominância marcante para o sexo feminino, e apresentação clínica mais precoce, entre a segunda e terceira décadas de vida (5, 11). Até recentemente, acreditava-se que a síndrome de Cushing clássica (manifesta) fosse a principal forma de apresentação clínica da PMAH. No entanto, a síndrome de Cushing subclínica parece, atualmente, ser a forma mais frequente da manifestação da doença, porém, ainda sub-diagnosticada (8). As co-morbidades mais frequentes nesta doença estão relacionadas às síndromes metabólicas, como hipertensão, diabetes, dislipidemia e obesidade central (9, 11). Em um trabalho recente do nosso grupo foi demonstrada, pela primeira vez, a presença da atividade metabólica da suprarrenal na PMAH através do exame de tomografia por emissão de pósitrons (PET) com fluordesoxiglicose (^{18}F-FDG), acoplada à tomografia computadorizada (^{18}F-FDG-PET/CT) (12). Paralelamente, analisamos a expressão gênica e proteica dos genes *SLC2A1* e *HK2*, na tentativa de elucidar um possível mecanismo pelo qual ocorre o aumento da atividade metabólica, à semelhança do que ocorre nas neoplasias suprarrenais malignas (13). No entanto, não foram identificadas alterações na expressão desses genes estudados, de forma que o mecanismo pelo qual há o aumento da atividade metabólica na PMAH ainda não foi elucidado. Além disso, a maior disponibilidade de exames radiológicos, sobretudo nas últimas

décadas, tem favorecido o diagnóstico incidental da PMAH. Os achados incidentais nas suprarrenais são identificados em 4% dos exames de imagem e cerca de 15% desses são nódulos adrenais bilaterais (8). É importante salientar que cerca de 38% dos pacientes de uma família brasileira, cujas análises foram recentemente publicadas (8), apresentavam acometimento unilateral da adrenal, o que torna o diagnóstico da PMAH um desafio. Portanto, os achados radiológicos unilaterais justificam a alteração do nome anteriormente utilizado para essa doença de *Bilateral Macronodular Adrenal Hyperplasia* para *Primary Macronodular Adrenal Hyperplasia*, que englobaria tanto os casos com acometimento unilateral assincrônico, quanto os casos clássicos bilaterais (8).

1.6 Mecanismos Moleculares Envolvidos na PMAH

O processo fisiopatológico que dá origem à PMAH com a formação característica dos nódulos bem como as eventuais alterações genéticas predisponentes, ainda não foram totalmente elucidados. Uma das principais hipóteses aventadas para o desenvolvimento da doença propõe a participação de receptores hormonais aberrantes ectópicos ou eutópicos acoplados à proteína G (GPCRs) no córtex suprarrenal de nódulos de pacientes diagnosticados com PMAH. Dentre eles estão os receptores do peptídeo inibitório gástrico (GIPR), da vasopressina (AVPR1a e AVPR2) e serotonina do tipo 4 (5HT4R), que inapropriadamente estimulariam a esteroidogênese e a hiperplasia da glândula, mimetizando a ação do ACTH ao se ligar ao MC2R, estimulando a via mediada pela PKA. Embora alguns autores defendam a hipótese de que a expressão destes receptores seria um evento inicial para a patogênese da PMAH (14), outros argumentam que a presença dos receptores aberrantes seria, mais provavelmente,

resultante da proliferação e da perda da condição de diferenciação celular (15). No entanto, estas questões ainda permanecem em aberto.

Em 2001, Pereira e colaboradores (16) identificaram a presença ectópica de ACTH detectado por imuno-histoquímica em grupos de células hiperplásicas nos nódulos da PMAH. Recentemente, Louiset e colaboradores (17) descreveram pela primeira vez uma complexa regulação do ACTH ectópico presente em grupos celulares dos nódulos hiperplásicos e confirmaram a presença do ACTH ectópico em uma subpopulação de células que, sob estímulo de agonistas dos receptores aberrantes, teria uma ação parácrina e autócrina, levando à produção do cortisol pela suprarrenal. Além disto, a concentração plasmática de ACTH, quantificada pelo cateterismo das veias adrenais, foi significativamente mais elevada quando comparada com a concentração plasmática periférica, demonstrando que a produção e secreção deste hormônio nos nódulos de PMAH, ao qual nos referimos como ACTH intrácrino. No entanto, a hipótese de que a produção ectópica de ACTH pela suprarrenal seria também responsável pela hiperplasia das células corticais adrenais ainda necessita de estudos comprovatórios. A origem destas células secretoras de ACTH ainda não é conhecida, no entanto, especula-se que são um subgrupo de células retidas do primórdio adreno-gonadal presente durante o desenvolvimento da glândula suprarrenal, que seriam, portanto, células *gonadal-like* (Figura 2).

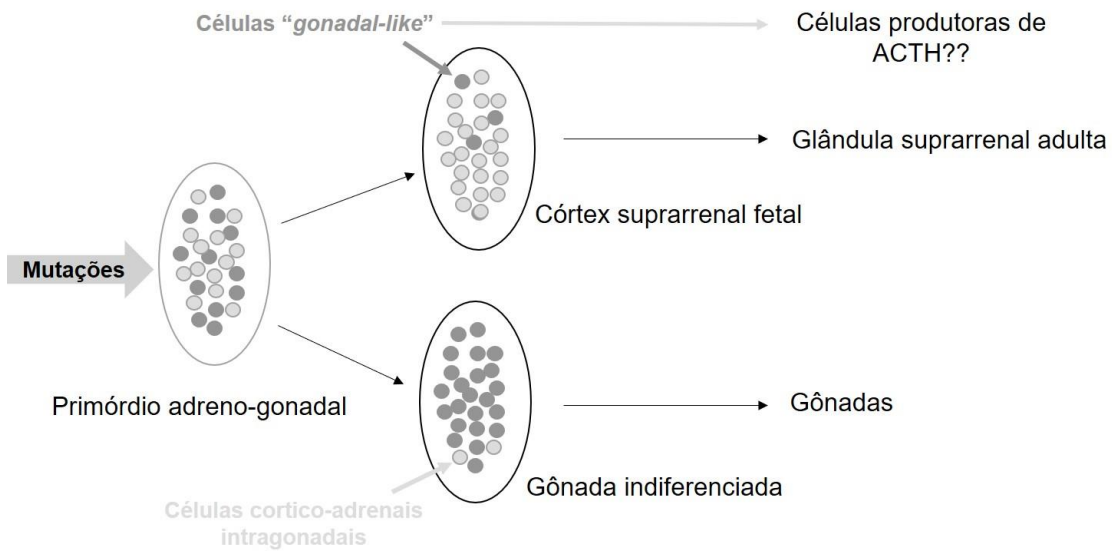

Figura 2 – Figura representativa da provável origem do ACTH intrácrino presente nas células de PMAH. Adaptado de: http://www.sfendocrino.org/article/617/la-lettre-surrenale-septembre-2014.

Ao longo dos anos, em busca de uma causa molecular da PMAH, foram identificadas mutações em pacientes diagnosticados com esta doença, como por exemplo mutações somáticas nos genes *MC2R, GNAS, MEN1* (18), no entanto, sempre em casos isolados. Recentemente, estudos independentes demonstraram que mutações no gene *armadillo repeat containing 5* (*ARMC5)* são uma causa frequente de PMAH, tanto na forma familial como na forma aparentemente esporádica da doença (8, 19-24). Mais especificamente, mutações germinativas em heterozigose no A*RMC5* foram identificadas em 38-55% dos pacientes com a doença em coortes diferentes (8, 19).

No Ambulatório de Suprarrenal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFM-USP), cerca de 24% dos pacientes (5/21), suspeitos de apresentarem a forma esporádica da PMAH apresentaram mutações germinativas no gene *ARMC5* (8). Apesar da forma esporádica da PMAH ser a mais comumente diagnosticada, a forma herdada da doença parece ser mais frequente do que inicialmente se pensava. De fato, se desconhece a real prevalência da forma familial da doença, uma vez que não é realizada uma

avaliação sistemática dos parentes dos pacientes com PMAH. Até a presente data, foram descritas na literatura poucas famílias com a forma herdada da doença (8, 19, 21, 24-26).

Na maior família já diagnosticada com a doença, foram identificadas mutações germinativas no gene *ARMC5*. Nesta genealogia, a doença demonstrou um padrão de herança autossômico dominante, com penetrância incompleta e expressão clínica e radiológica variável (8), uma vez que indivíduos idosos com a mutação do *ARMC5* não apresentaram nenhuma evidência, laboratorial ou radiológica da doença. A doença acometeu homens e mulheres com uma proporção semelhante, estava presente em três gerações consecutivas, foi herdada tanto pelo sexo masculino (pai) quanto pelo feminino (mãe), e acometeu cerca de 50% dos irmãos em alguns segmentos da família. Trata-se da genealogia com o maior número de casos de PMAH e a mais extensivamente avaliada. Após o estudo de 5 gerações dessa família foi possível observar que o desenvolvimento da hiperplasia macronodular nem sempre é sincrônico ou com a presença de múltiplos nódulos. Portanto, restringir a investigação somente aos casos mais avançados que apresentam a doença bilateral, como sugerido por vários autores (17, 23, 27), exclui a possibilidade de diagnóstico precoce. Esses dados justificam mais uma vez o nome de *Primary Macrondular Adrenal Hyperplasia* (PMAH), que engloba todas as variantes da expressão da doença (8).

Dentre os possíveis mecanismos que regulam a esteroidogênese na PMAH (Figura 3) estão receptores ectópicos ou eutópicos aberrantemente expressos acoplados à proteína G, que, após ligação com seus respectivos ligantes, estimulam a via PKA, principal via reguladora da esteroidogênese. Além disso, a presença do ACTH intrácrino torna as células que compõem os nódulos hiperplásicos

independentes da ação do ACTH hipofisário e, portanto, independentes do controle do eixo HPA, o que mantem a secreção de cortisol e a progressão da hiperplasia. Somado a isso, mutações no gene *ARMC5,* que causam a perda de função da proteína (27), podem contribuir de alguma forma para o aparecimento da doença.

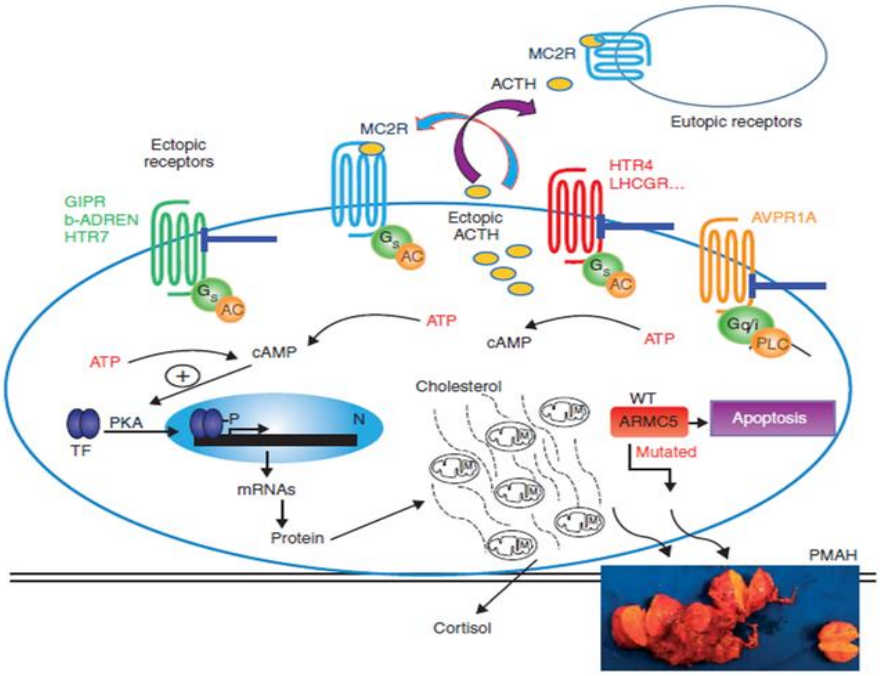

Figura 3 – Regulação anormal do córtex adrenal regulado por receptores aberrantes, ACTH ectópico e mutações no gene ARMC5. Fonte: Fragoso e cols, 2015 (28).

1.7 O gene e proteína Armadillo repeat containing 5 (ARMC5)

A proteína ARMC5 pertence à família das proteínas Armadillo, no entanto, ainda se desconhece o papel desempenhado pela mesma na fisiopatologia da PMAH. As proteínas da família Armadillo (29) são caracterizadas por apresentar repetições de aproximadamente 42 aminoácidos compostas por 3 α-hélices, que foram caracterizadas primeiramente em segmentos de proteínas Armadillo em *Drosophila* (30). As unidades das proteínas ARM repetidas, formam, em conjunto, uma super-hélice, que formam uma plataforma versátil que permite interações com outras proteínas, e que por isso apresentam mais de uma função celular. As

proteínas ARM em eucariotos, de um modo geral, têm importantes e diversas funções celulares (31).

Uma das proteínas da família Armadillo mais estudada é a β-catenina (*CTNNB1*, i.e. Catenin (cadherin-associated protein), beta 1; ARM em *Drosophila*) que apresenta interações com outras proteínas, e tem funções relacionadas ao desenvolvimento, na adesão celular e na sinalização, uma vez que é capaz de se deslocar até o núcleo e alterar a expressão gênica (32). Outra proteína da família ARM, cuja função tem sido elucidada, é a proteína ARMC8 que parece fazer parte do complexo de degradação do proteasoma/ubiquitina em leveduras e humanos. Além disso, em humanos, os ARM-repeats de ARMC8 parecem potencializar a interação das proteínas receptores de membrana com um adaptador de sinalização, permitindo ubiquitinação e degradação lisossomal (31). De uma forma geral as proteínas ARM são proteínas conservadas, e, portanto, devem ter um papel importante em vários órgãos, mas ainda permanecem com suas funções pouco ou nada conhecidas, como é o caso da ARMC5.

Assié e colaboradores (27) demonstraram que o gene *ARMC5* selvagem transfectado transientemente leva à morte celular de células da linhagem de carcinoma adrenocortical humana, células H295R. Demonstraram ainda que mutações do tipo missense no *ARMC5* levam à perda da capacidade desta proteína de induzir apoptose ou induze-a mais tardiamente, demonstrando a importância das mutações na função desta proteína. Além disto, utilizando o silenciamento do *ARMC5*, foi observada a diminuição da expressão do RNAm do receptor de ACTH, o *MC2R*, do fator esteroidogênico 1 (*SF1),* de algumas enzimas esteroidogênicas, como *CYP11A1* e *CYP17A1,* assim como da síntese do cortisol, sugerindo que a proteína ARMC5 pode ser importante na regulação da esteroidogênese. A

demonstração de um segundo evento no gene *ARMC5* nos nódulos de hiperplasia, seja uma mutação somática ou perda de heterozigose (LOH), somado aos dados dos estudos funcionais realizados nas células H295R, onde a hiperexpressão de *ARMC5* levou à morte celular, sugere que este gene possa se comportar como um indutor de apoptose (27).

O gene *ARMC5* está localizado no cromossomo 16p11.2, apresenta 6 exons na sua isoforma mais comum (NM_001105247) e codifica uma proteína de 935 aminoácidos, apresentando dois domínios distintos: são eles o domínio ARM-repeat na porção N-terminal, abrigando 7 repetições, e o BTB/POZ (Bric-aBrac, Tramtrack, Broad-complex/Pox vírus e Zinc finger) na porção C-terminal, como apresentando na Figura 4. Ambos os domínios são altamente conservados e medeiam interações proteína-proteína, o que novamente sugere que o *ARMC5* tenha coparticipação com outras proteínas (33, 34).

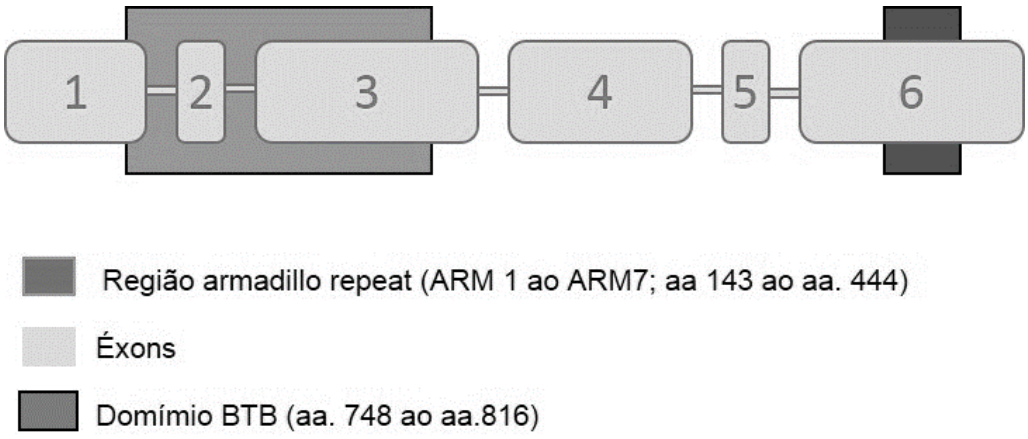

Figura 4 – Representação da estrutura do gene *ARMC5,* com seus éxons e domínios responsáveis pelas interações proteína-proteína.

Recentemente, as quatro isoformas do gene *ARMC5* foram analisadas em tecidos humanos normais, mostrando que ao menos uma isoforma deste gene é expressa ubiquamente no corpo humano, e que apenas sete tecidos do corpo

apresentaram todas as isoformas, dentre eles a suprarrenal e o cérebro, sugerindo que o *ARMC5* possa também estar envolvido em outras patologias (35).

Neste contexto e reforçando a necessidade de analisar a importância da expressão do *ARMC5* em diferentes órgãos, foi identificada uma alta frequência de meningiomas em pacientes com PMAH, na sua forma familial ou esporádica, que apresentavam mutação germinativa do gene *ARMC5.* Como exceção, há um caso cuja patogênese molecular da paciente estava associada a mutação somática em ambas as adrenais do gene *GNAS* (guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating) (36). Recentemente, Elbelt e cols (37) descreveram uma paciente com PMAH e meningioma cuja mutação germinativa e somática no gene *ARMC5* foi identificada em leucócitos periféricos e no tecido do meningioma, o que sugere um papel adicional dessa mutação para desenvolvimento concomitante de meningioma intracranial e PMAH, conforme observado na clínica.

Ainda que não se saiba inteiramente qual o papel do *ARMC5*, recentemente foi demonstrado que o *ARMC5* tem uma importância vital no desenvolvimento fetal de camundongos, na diferenciação de linfócitos T e na resposta imune de uma forma geral. Além disso, o *ARMC5* não apresenta atividade enzimática, e sua função depende de interações com outras proteínas, permitindo que esta interação module diferentes vias (38).

1.8 Justificativa

Nos últimos anos, foram armazenados em nitrogênio líquido tecidos adrenais hiperplásicos de pacientes com PMAH para formação de um banco de tecidos. Parte desse material foi fornecido para a obtenção de culturas de células no Laboratório de Estrutura e Função Celular do Departamento de Anatomia do ICB-USP, sob supervisão da Profa. Dra. Claudimara Lotfi.

Uma vez que há uma alta incidência do envolvimento do gene *ARMC5* na PMAH, que o único estudo funcional realizado com o gene foi feito em uma linhagem de carcinoma adrenocortical, células H295R, e partindo do pressuposto que a PMAH é uma doença absolutamente benigna, sem evolução para malignidade, utilizando culturas de células obtidas de pacientes com diagnóstico da doença teríamos um sistema biológico mais adequado para estudo funcional do *ARMC5*. Portanto, nos propusemos a realizar a caracterização das culturas de células e os estudos funcionais dessas culturas de células a fim de identificar possíveis mecanismos fisiopatológicos envolvidos no estabelecimento dos macronódulos, ou seja, o papel do *ARMC5* na PMAH.

2. Objetivo Geral:

Analisar a importância funcional do gene *ARMC5* em culturas de células de hiperplasias adrenocorticais obtidas de pacientes portadores ou não de mutações no *ARMC5*, para uma maior compreensão da fisiopatologia da PMAH.

Objetivos específicos:

2.1. Caracterizar as culturas de células que foram obtidas dos fragmentos das hiperplasias, através de análises morfológicas e funcionais como a:

- ✓ Identificação das células esteroidogênicas por coloração por *Oil Red O;*
- ✓ Análise da expressão de ACTH intraadrenal por imunocitoquímica;
- ✓ Análise da presença da proteína ARMC5 nas culturas de células utilizadas, utilizando imunofluorescênica e *imunoblotting;*
- ✓ Análise da sinalização desencadeada por estímulos com ACTH, vasopressina e forskolina nas culturas de células de PMAH, bem como a medida da concentração do cortisol.

2.2. Caracterizar as culturas de células que foram obtidas dos fragmentos das hiperplasias através de análises moleculares como a:

- ✓ Identificação molecular por DNA *fingerprint* das culturas de células;
- ✓ Detecção da presença de mutação nas culturas de células obtidas, através de sequenciamento do gene *ARMC5;*
- ✓ Análise da expressão do *ARMC5,* das enzimas esteroidogênicas (*3BHSD2* e *CYP17A1*), *MC2R, POMC, PCSK1* e receptores ectópicos (*AVP1aR, AVP2R, GIPR* e *5HT4R*) através de qPCR.

2.3. Analisar a função do gene ARMC5 através do (a):

- ✓ Silenciamento do gene *ARMC5* nas células H295R e nas células de PMAH, células T179, utilizando transdução lentiviral;
- ✓ Análise da expressão enzimas esteroidogênicas (*StAR, CYP11A1, CYP17A1, 3BHSD2*), dos genes *MC2R*, *SF-1, CCNE1* e da ativação da via ERK/MAPK;
- ✓ Quantificação do cortisol na linhagem de células H295R silenciadas para o *ARMC5;*
- ✓ Ensaios de viabilidade e proliferação na linhagem H295R e na cultura de células T179 silenciadas para o *ARMC5;*
- ✓ Hiperexpressão do *ARMC5* nas células H295R, T112, T177 e T179 para:
  - Análise da expressão de enzimas esteroidogênicas e *MC2R*
  - Medida do cortisol na linhagem H295R
  - Ensaios de viabilidade e apoptose.

3. Material e Métodos

3.1. Pacientes

Foram avaliados 13 pacientes não relacionados entre si (11 mulheres e 2 homens), com idade entre 45 e 69 anos (58.3 ± 8.8 anos). O diagnóstico de

Síndrome de Cushing (9/13) ou Cushing subclínico (4/13) foi estabelecido de acordo com dados clínicos, laboratoriais e imagem radiológica. A investigação genética identificou mutações germinativas no gene *ARMC5* em 8 dos 13 pacientes, dos quais 5 são carreadores de segundos eventos, ou seja, de uma nova mutação somática ou perda de heterozigose (LOH). Além disto, 4 pacientes apresentaram a forma familial da doença, enquanto que os demais foram considerados casos aparentemente esporádicos. Todos os pacientes foram submetidos à adrenalectomia total da maior adrenal e adrenalectomia contralateral parcial da menor adrenal (39), que correspondiam à maior e menor captação de SUV no PET/FDG, respectivamente. Imediatamente após a cirurgia, os fragmentos foram coletados e preservados em frascos contendo meio DMEM (Gibco, NY, USA) até o processamento. Parte do restante do material foi congelado em nitrogênio líquido e parte foi encaminhada para diagnóstico histológico.

Após o diagnóstico clínico, o diagnóstico histológico de PMAH foram confirmados por um patologista especializado. Os dados clínicos dos pacientes podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados clínicos dos pacientes.

P	Cc	Sexo	Idade	Peso (Kg)	Clínica	Tamanho AE (cm)	Peso AE (g)	Tamanho AD (cm)	Peso AD (g)	ACTH	* F Urinário (ug/24hs) % acima do limite	F sérico basal ug/dL	F pós-dexa (DST)
P1 *+	T52	F	65	60	C	2.6	-	7	33.7	<5	**410/ 32%	39.8	12.2
P2 *+	T112	F	45	55.5	C	14.7	65.8	5.7	11.8	<5	**333/ 7.4%	22.3	18.7
P3 *+	T126	F	56	93.5	C	-	-	15	190	<5	**1616.5/ 421%	44.4	-
P4 *	T127	F	63	106.6	C	14	158.9	7.5	15.9	<5	**450/ 45%	25.9	31.8
P5 *+	T131	M	45	94	C	14	200	8.5	22.9	<5	**1419/ 357%	27.1	-
P6 *+	T167	F	68	81.9	C	10.6	70.2	9	42	<2	#259.8/ 331%	25	15.5
P7 *	T177	F	47	109	C	4.6	46.7	6	39.1	<2	#213.3/ 255%	17.3	9.1
P8	T179	F	51	94.3	SBC	1.3	12.5	2.7	-	9	-	18.9	15.6
P9	T180	F	69	54	SBC	2	21.3	4.5	29.5	18.4	**151.2	23.8	3.9
P10	T185	F	59	53.8	SBC	5.5	20	-	25	2.5	#28.1	11.2	4.3
P11	T188	F	69	62.9	SBC	6	17.3	11	31.5	2.7	#34.4	10.7	5.8
P12	T190	F	61	11	C	9	90.3	6.2	20	<2	#24.7	13.3	13.9
P13*	T191	M	61	95	C	10.5	22	9	30.8	<5	#17.5	9.1	3.7

P = Paciente; *pacientes carreadores de mutações no *ARMC5;* + = familial; Cc = Cultura celular; F= Feminino / M= Masculino; C=Síndrome de Cushing; SBC= Síndrome de Cushing Subclínica; AE= adrenal esquerda; AD= adrenal direita; ACTH = referência (7.2-63.30 pg/mL); F = cortisol sérico referência (6.7-22.6 ug/dL); **referência cortisol urinário (50-310 ug/24hs); # referência cortisol urinário (4,2-60 ug/24hs); DST = teste de supressão pós dexametasona (1 mg vo) *cutoff* = 1.8 ug/dL

3.2. Culturas de células de PMAH

Foram utilizadas culturas de células obtidas de fragmentos de macronódulos adrenocorticais de pacientes diagnosticados com PMAH. Os fragmentos selecionados de porções aparentemente viáveis não hemorrágicas foram dissociados por digestão enzimática em meio contendo de 2-4 mg/mL de colagenase (Gibco, NY, USA) contendo 1 µg/mL DNaseI (Gibco, NY, USA) por um tempo variável, dependendo do tamanho e constituição tecidual do fragmento. Subsequentemente, o material foi dissociado mecanicamente por pipeta volumétrica e posteriormente centrifugado a 700 RPM por 10 min. para formação de pellet de células. As células obtidas foram plaqueadas em meio específico para cada tipo celular, soro fetal bovino (Gibco, NY, USA) e antibióticos, e mantidas em ambiente umidificado com 95% ar, 5% CO_2 a 37°C.

Para controle dos experimentos foram utilizadas as linhagens: 1) de carcinoma adrenocortical humano, NCI-H295R (40) e 2) de células embrionários de rim humanas, HEK293T. Além das linhagens citadas, utilizamos também uma cultura de células de córtex de adrenal normal obtida em nosso laboratório, a partir de fragmento adrenocortical de um paciente do sexo masculino de 60 anos de idade, que passou por uma nefrectomia devido a um câncer renal. As células provenientes do processamento de fragmentos de PMAH, a cultura de adrenal normal e a linhagem HEK293T e HEK293FT (células empacotadoras virais) foram cultivadas em meio DMEM 10% SFB, enquanto a linhagem H295R foi cultivada em meio RPMI (Gibco, NY, USA) 2% SFB + 1% ITS (insulina, transferrina e selênio). Todas as culturas de células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO_2.

3.3. Caracterização das culturas de células obtidas de nódulos adrenais hiperplásicos de pacientes diagnosticados com PMAH

- Caracterização morfológica:

3.3.1 Coloração por *Oil Red O*

O *Oil Red* O ($C_{26}H_{24}N_4O$) é um corante solúvel em gordura utilizado para detecção e marcação de triglicerídeos neutros, lipídeos e algumas lipoproteínas em cortes histológicos e células fixadas. Tem a aparência de um pó vermelho com absorbância máxima em 518 nm. O *Oil Red* O substitui amplamente o Sudan III e o Sudan IV, produzindo uma coloração vermelha muito mais intensa, tornando as marcações mais facilmente visíveis (41). A coloração de vesículas lipídicas com *Oil Red* O foi visualizada nas células plaqueadas em lamínulas, previamente lavadas duas vezes com tampão fosfato pH=7.4 (PBS), fixadas com formaldeído a 3,7% por 10 min., e então lavadas três vezes com água gelada. Após lavagem por 2 min. com isopropanol 60% as células foram incubadas por 30 min. em uma solução de uso de *Oil Red* O [3:2 de solução-estoque ORO em água milli-Q; solução estoque: 1,4 g de *Oil Red* O (O-0625, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) em 400 ml de isopropanol 99%]. Após lavagem rápida com isopropanol 60% e diversas lavagens com água Milli-Q, as células foram contra coradas com Hematoxilina de Harris por 50 seg. e diferenciadas com carbonato de lítio saturado. A montagem das lamínulas em lâminas foi feita com glicerol 10% em PBS. As imagens foram capturadas em microscópio de luz Nikon. A quantificação foi por análise de imagem das células que apresentaram gotículas lipídicas citoplasmáticas em pelo menos 5 campos diferentes, cuja área foi determinada segundo a objetiva utilizada.

3.3.2 Imunocitoquímica

As células provenientes das culturas foram plaqueadas em lamínulas com 20.000 células cada, e fixadas por 30 min. em 3,7% formaldeído (Merck, Darmstadt,

Germany). Subsequentemente, as células foram hidratadas com PBSA e permeabilizadas com PBSA + Triton 1% (USB, Cleveland, USA) durante 20 min. a temperatura ambiente. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com soro normalizador (Vector Laboratories, CA, USA) por 1h em temperatura ambiente. Após este período, as lamínulas foram lavadas com PBSA e incubadas em câmara úmida a 4°C overnight com o anticorpo primário policlonal anti-ACTH (1:100; Abcam, ab74976), produzido em coelhos, diluído em PBSA + 0,3% Triton + 1mg/ml de BSA (Sigma Aldrich Corporation, St Louis, USA). Em seguida, as lamínulas foram novamente lavadas com PBSA e incubadas a temperatura ambiente com o anticorpo secundário biotinilado (1:200; Vector Laboratories, CA, USA) diluído em PBSA + 0,3% Triton. Ao término deste tempo, as lamínulas foram incubadas com o complexo AB-avidina-biotina (Vector Laboratories, CA, USA) por 1h, no qual o complexo AB une-se ao anticorpo secundário, formando um complexo avidina-biotina-peroxidase. A revelação da reação foi feita através do cromógeno de diaminobenzidina (DAB) (Sigma Aldrich Corporation, St Louis, USA), que é oxidado pela peroxidase, formando um precipitado marrom no local onde a proteína é expressa, por 1 min. Após lavagens com água Milli-Q, as células foram contra coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Germany), diferenciadas com carbonato de lítio (Merck, Darmstadt, Germany) e montadas em lâminas com óleo mineral.

3.3.3 Imunofluorescência

As células foram plaqueadas, fixadas e permeabilizadas como descrito acima. Em seguida, foi realizado bloqueio dos sítios inespecíficos com PBSA + 0,3% Triton + 5% soro de burro durante 1h 30 min., em seguida foram feitas 3 lavagens de 10

min. cada com PBSA. Após as lavagens, as lamínulas foram incubadas com anticorpo anti-ARMC5 (1:100, Abcam) diluído em PBSA + 0,3% Triton + 1% soro de burro *overnight* a 4°C. Após a lavagem, foi feita incubação com anticorpo secundário fluorescente anti-*rabbit* acoplado ao fluoróforo vermelho Alexa Fluor 555 (1:100) durante 1h a temperatura ambiente, em câmara escura. Após subsequentes lavagens com PBSA, as lamínulas foram montadas em lâminas com Prolong Gold (Life Technologies).

- Caracterização molecular

3.3.4 Identificação e autenticação das culturas de células pelo STR-DNA profile

Essa técnica tem como objetivo estabelecer a "identidade molecular" das culturas de células para que a mesma possa ser revalidada, sempre que necessário, ao longo das diferentes passagens. Desta forma é excluída a possibilidade de contaminação cruzada por outras linhagens. O método de "DNA *fingerprint*" faz uma análise simultânea de 15 loci STRs (*short tendem repeats*) e o gene amelogenina, para identificação do gênero, em uma reação "multiplex" de PCR utilizando o kit AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification (Life Technologies Corporation, Foster City,CA, USA). Os amplicons foram separados por eletroforese capilar e analisados usando um Gene Mapper software da Life Technology. Cada pico relevante na eletroforese representa um alelo que é contado e incluído no banco de dados. A escolha desse produto é recomendada pela ATCC (American Type Culture Collection): The Global Bioresource Center para certificação da origem da cultura de células. O DNA fingerprint foi realizado em colaboração com Dra. Cintia Fridman, no Departamento de Medicina Legal da FMUSP.

3.3.5 Sequenciamento do gene *ARMC5*

O DNA genômico foi isolado de culturas celulares de acordo com protocolos padrão (42). Foi realizada a amplificação da região codificadora do gene *ARMC5* através de PCR. Foram utilizados *primers* intrônicos específicos para amplificação das regiões de interesse (Tabela 2). Reações amplificadoras foram realizadas em um volume total de 25µl contendo: 50 ng de DNA genômico, 200 µM dNTP (Life Technologies Corporation), 15 pmol de cada *primer* específico (Integrated DNA Technologies), 0.75 U da enzima GoTaq®DNA Polymerase (Promega Corporation) e 5µl de tampão 5xGreen Go Taq Reaction Buffer (Promega Corporation). A PCR foi realizada em termociclador Veriti (Life Technologies Corporation) seguindo os passos descritos na Tabela 2. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1.5% com marcador de DNA *SYBR Safe* (Life Technologies Corporation) e visualizados através de transiluminação em luz UV. A intensidade do sinal emitido pelos produtos de PCR foi comparada com a emitida pelo *Low DNA Mass Ladder* (Life Technologies Corporation, CA, USA), um marcador de peso molecular cuja concentração é conhecida, que permite quantificar o DNA amplificado. Para purificação dos produtos de PCR foi utilizado ExoSAP-IT (Affymetrix Inc, SC, USA) contendo enzima fosfatase alcalina e exonuclease I a 37°C (15 min.) e em seguida a 80°C (15 min.). À solução purificada foi adicionado 1 µl de *Big Dye Terminator* (Life Technologies Corporation, CA, USA), 1µl de tampão *Save Money* (0.2 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl2) e 5 pmol de primers (*forward* ou *reverse*), utilizando um termociclador Veriti (Life Technologies Corporation, CA, USA): 25 ciclos a 96°C (10s), 50°C (5s) e 60°C (4 min.). Os produtos desta reação foram submetidos a eletroforese capilar em um sequenciador automatizado

ABIPRISM3100 Genetic Analyzer (Life Technologies Corporation, CA, USA) e o eletroferograma gerado foi analisado utilizando *Sequencher* 5.0.1 *software* (Gene Codes Corporation). As sequências obtidas foram comparadas com as sequências do banco de dados do *National Center for Biotechnology and Information* (NCBI). O impacto funcional das variantes detectadas foi analisado *in silico*. O sequenciamento automático e sua interpretação foram realizados pela Dra Mirian Nishi e pela Profa. Maria Candida BV Fragoso, no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, Hospital das Clínicas, FMUSP.

Tabela 2 - *Primers* para amplificação da região codificadora do gene *ARMC5.*

EXONS	*FORWARD*	*REVERSE*	Tm (C)
exon 1	gtcggacttctgggctgtt	ctcgctgacgctgtttagc	60.3 / 59.9
exon 2	ccgaccattagcctcttctg	ctgtcaggctctccacaagc	59.8 / 61.2
exon 3	gctggtaagaggctgtgagg	ctcacgacataggaggcaca	60.0 / 59.9
exon 4	aggatcccacaactgcattc	caggtgaggcgtgacagaa	59.9 / 60.1
exon 5 e 6	cttctggagcagggtggtct	ggaacacctcacccactgac	61.8 / 60.4

Tm = temperatura de *melting*

3.3.6 Análise da expressão dos genes *ARMC5, MC2R, POMC, 3BHSD2, StAR CYP17A1, CYP11A1, SF-1, AVP1aR, AVP2R, GIPR* e *5HT4R*

Para extração de RNA das células da linhagem H295R e das culturas de células de PMAH foram plaqueadas $3x10^5$ e $5x10^4$ células, respectivamente, em placas de 24 poços. Após 24h e 36h, respectivamente, a extração de RNA total das culturas celulares foi realizada com Trizol (Invitrogen, CA, USA), em protocolo estabelecido no laboratório, cuja integridade foi avaliada através de eletroforese com gel de agarose a 2%. A concentração e a pureza do RNA extraído foram

analisadas através do equipamento NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, MA, USA), onde as amostras para serem consideradas íntegras, apresentaram a relação 260nm/280nm entre 1.7-2.0, e 260nm/230nm, entre 1.8-2.2. O cDNA foi sintetizado a partir de 1µg de RNA total utilizando o kit de síntese SuperScript III First Strand Synthesis Supermix (Invitrogen, CA, USA).

A reação qPCR foi realizada no equipamento de PCR em tempo real, 7500 *Real Time PCR System* (Appiled Biosystems, CA, USA) e com o método *Taqman Gene Expression Assay* para quantificação da expressão gênica relativa dos genes *MC2R, CYP17A1 e 3BHSD2,* e o método *SYBR Green* para análise da expressão gênica relativa dos genes *ARMC5, POMC, AVP1aR, AVP2R, GIPR, 5HT4R, CYP11A1, StAR e SF-1* de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems, CA, USA). A Tabela 3 contém as sequências dos primers utilizados. Para a análise da expressão gênica um valor de *cycle threshold* (CT) na curva de amplificação foi selecionado para cada amostra em triplicata e normalizado com níveis de expressão de *GUSB* de cada método utilizado, utilizando como calibrador um pool comercial de adrenal total.

Tabela 3 - Sequências dos *primers* para as reações de qPCR.

GENE	*FORWARD*	*REVERSE*	*Size* (pb)
ARMC5	CTCGGAGGCATACTCCCTTT	GTTCGGTTCTGGATGCTGTC	68
GUSB	AGCCAGTTCCTCATCAATGG	GGTAGTGGCTGGTACGGAAA	160
POMC	CAGCCAGTGTCAGGACCTC	GGTCAGAGGCTGCTCGTC	121
StAR	CATACTCTAAACACGAACCCCACC	GTCCCACCCTGCCTCTGAAG	168
NR5A1	GAGAGCCAGAGCTGCAAGAT	GTACATCGGCCCAAACTTGT	147
AVPR 1a	CGGCTTCATCTGCTACAACATC	CGAGTCCTTCCACATACCCGT	105
AVPR V2	GTGGCCAAGACTGTGAGGAT	CATAGATCCAGGGGTTGGTG	181
5HT4R	CGGGCAGGAGCCTCCTCCGAGAG	CAAGGGACAGTCTGGCCCAGAATG	347
GIPR	CCTGATCGCCCCTGCACGAAC	AGGTCGAGGTAGCAGACGGTCTCG	326

PCSK1	CTCTTCGCAGAGCAACCAGGA	TTCGCTCCATAGCTCACACAC	145
GUSB	Hs00939627_m1		96
ARMC5	Hs01000278_m1		57
CYP17A1	Hs01124136_m1		72
HSD3B2	Hs00605123_m1		136
MC2R	Hs00300820_s1		71

A expressão relativa foi analisada a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (42), onde ΔCT é a diferença entre os valores de CT selecionados de uma dada amostra e o CT de um *pool* de adrenais normais. A expressão dos genes analisados nas culturas de células de PMAH foi comparado à expressão em um *pool* comercial de adrenais normais (BioChain, CA, USA), relação esta que nos permite obter a expressão relativa de cada gene.

3.3.7 Análise da expressão proteica por *immunoblotting*

Para a obtenção do lisado proteico para os experimentos de *immunoblotting*, foram plaqueadas $6x10^5$ e $1.5x10^4$ células da linhagem H295R e culturas de PMAH, respectivamente. Após 24h e 36 horas do plaqueamento, respectivamente para cada tipo celular, as células foram lisadas com o tampão de lise de proteínas RIPA (Tris-HCl 50mM; NP40 0,5%; NaCl 150mM; EDTA 0,1mM) suplementado com um coquetel de inibidores de protease e fosfatase (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) utilizando um *scrapper*. O material recolhido foi sonicado 5 vezes durante 1 min., com intervalos de 1 min. no gelo, em seguida centrifugado a 14.000 RPM durante 15 min., e aliquotados em microtubos estéreis. Uma das alíquotas foi quantificada em espectrofotômetro (495nm) e 10 μg do lisado obtido foi aplicado em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). As proteínas, após separadas, foram transferidas para

uma membrana de nitrocelulose utilizando o sistema de transferência úmida (Bio-Rad, CA, USA). As membranas foram coradas com solução *Ponceau* para avaliar a eficiência da transferência. As membranas foram incubadas com TBST + 5% de leite durante 1h30min. para bloqueio dos sítios inespecíficos. Após rápida lavagem com TBST, as membranas foram incubadas *overnight* com anticorpo primário (anti-beta actina sc-47778; 1:1000, anti-ARMC5 Novus Biologicals; 1:1000, anti-ERK Cell Signalling 1:1000, anti-phospho ERK1/2 Cell Signalling 1:1000) diluído em TBST + 5% leite a 4°C. Após 3 lavagens de 10 min. com TBST, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (1:2000) durante 1h, à temperatura ambiente. Para revelação foi utilizado o kit ECL-Amersham (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Germany) em um digitalizador de quimioluminescência (IMAGER 600, GE Healthcare, Life Sciences, Freiburg, Germany), onde as bandas foram visualizadas e quantificadas através de densitometria, e posterior análise estatística.

- Caracterização funcional

3.3.8 Análise da resposta da cultura de células T190 ao ACTH, Vasopressina e Forskolina

Para analisar a resposta das culturas de células de PMAH ao ACTH e à vasopressina (AVP), utilizamos as culturas de PMAH, T190 e T191 (com e sem mutação no *ARMC5*, respectivamente). A Forskolina (FK) foi utilizada como controle positivo, por estimular a atividade da via PKA em células esteroidogênicas independente de receptores acoplados à proteína G.

Foram plaqueadas $5x10^4$ células da cultura T190 em placas de 24 poços. Após 24h do plaqueamento, o meio de cultura foi trocado e suplementado com ACTH 10^{-7}M (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), AVP 10^{-8}M (Sigma-Aldrich, St Louis,

USA) e FK 10^{-6}M (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Para inibição da via PKA, as células foram tratadas com 10μM de H89 (Cell Signalling Technology, MA, USA) por 30 min. antes dos tratamentos. As concentrações de ACTH, AVP e FK foram utilizadas baseado nos estudos de Mazzuco e cols (43); Hofland e cols (44), e a concentração do reagente H89 foi estabelecida de acordo com as instruções do fabricante.

Para a quantificação do cortisol, o meio foi recolhido 48h após o estímulo e as proteínas totais foram extraídas das células de acordo com protocolo descrito anteriormente. Para análise dos genes envolvidos nas sinalizações desencadeadas pelos ligantes estudados, foram realizados tratamentos com por 2 e 6h, seguidos de extração de RNA total e síntese de cDNA, conforme descrito anteriormente.

- Estudo funcional com o gene *ARMC5*

3.4 Silenciamento do gene *ARMC5* através de transdução lentiviral

A interferência por RNA é um processo pós-transcricional que permite o silenciamento de uma proteína de forma estável e específica por meio de shRNA (*short hairpin* RNA), que é inserido na célula através de vetores lentivirais. Uma vez integrado ao genoma, o shRNA é processado pela enzima Drosha, cujo produto é processado pela enzima Dicer e pelo complexo denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*). Esse complexo cliva o mRNA da sequência de interesse, levando à perda de função do gene e da proteína e, portanto, ao seu silenciamento.

Produção das partículas virais

Os plasmídeos MISSION® (*bacterial glycerol stock;* Sigma-Aldrich (shRNA e pLKO.1) consistem em bactérias *Escherichia coli* transformadas que foram

amplificadas através da inoculação de 50uL do estoque em 500 mL de meio de cultura LB, cultivados *overnight* em agitador a 150 RPM/37°C e selecionados com Ampicilina (100ug/mL). Foi realizada extração do DNA plasmideal utilizando o kit Midi/Maxi Prep (Qiagen, Hilden, Germany). Para a produção das partículas lentivirais, estes plasmídeos foram transfectados com Lipofectamina (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) em células empacotadoras HEK293FT, que produziram e secretaram para meio de cultura as partículas virais. O sobrenadante viral foi coletado e ultracentrifugado a 50.000*g* e armazenado em freezer a - 80°C. Os vetores utilizados continham genes de resistência à ampicilina e puromicina para seleção dos insertos. A transdução e produção da carga viral foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Carlos Menck, com a assistência técnica da Dra. Veridiana Munfurd. As sequências utilizadas estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Sequências dos guias utilizados para shRNA.

CLONE ID	SEQUÊNCIA
NM_024742.1-3991s1c1	CCGGCCTGTCCTGCATCATTTGCATCTCGAGATGCAAATGATGCAGGACAGGTTTTTTG
NM_024742.1-1024s1c1	CCGGGAAGACAGACAGCATCCAGAACTCGAGTTCTGGATGCTGTCTGTCTTCTTTTTTG
NM_024742.1-4424s1c1	CCGGCAAGGATGAATTGGCTGTGAACTCGAGTTCACAGCCAATTCATCCTTGTTTTTTG

Transdução viral

Para a transdução viral, foram plaqueadas $3x10^4$, 10^4 e 10^4 células da linhagem H295R, HEK293T e da cultura de PMAH, T179, respectivamente, em placa de 24 poços. Vinte e quatro horas após o plaqueamento, o meio foi descartado e foram adicionados 200μL de Meio RPMI puro (Gibco, NY, USA) e 30μL do sobrenadante

viral referente a cada shRNA e ao seu controle, pLKO.1. Após 4h, foram adicionados 250μL de meio RPMI, 2% SFB e 1% ITS. 24h após a transdução viral o meio foi de trocado por 1mL de meio RPMI 2% SFB + 1% ITS. Após 48h, foi iniciada a seleção das células transduzidas com o 30μg/mL, 1μg/mL e 1μg/mL de Puromicina (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) nas linhagens H295R, HEK293T e da cultura de PMAH, T179, respectivamente, onde somente as células estavelmente transduzidas sobreviveram. Os resultados serão apresentados com a sequência de shRNA mais eficiente.

- Análise dos efeitos biológicos do silenciamento do gene *ARMC5*

3.4.1 Curva de crescimento

O azul de tripan é um corante vital, cuja reatividade somente ocorre em células cuja membrana celular esteja danificada, isto é, cora somente células não viáveis cujas membranas celulares estão permeáveis pela perda de sua integridade. Desta forma, 10 min. após a incubação com Tripan, é possível diferenciar células viáveis das não viáveis.

Para a curva de crescimento, foram plaqueadas $5x10^5$ e $8x10^4$ células H295R e T179, respectivamente, tanto pLKO.1 quanto shRNA, em placas de 24 poços. As células foram ressuspensas em 0,5% azul de tripan em PBSA, para contagem em triplicata por dia, em 24, 48, 72 e 96h, para cada tipo celular.

3.4.2 Análise de viabilidade celular por meio do ensaio colorimétrico, MTS

O *MTS CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay* (G5430, Promega Corporation, Madison, USA) é um método colorimétrico de determinação do número de células viáveis. O reagente contém o componente tetrazolium MTS,

de coloração amarela, que é biorreduzido pelas células, formando um composto de tom castanho escuro, o formazan, que é solúvel no meio de cultura. Esta biorredução é feita pelo NADHP ou NADH produzido pelas enzimas dehidrogenases das células metabolicamente ativas. A concentração de formazan produzido é quantificado e é proporcional ao número de células viáveis. Dessa forma, o ensaio de MTS é considerado uma avaliação indireta da proliferação celular, pois, teoricamente, com o aumento do número de células ocorreria aumento da produção de formazan e, por consequência, do grau de absorbância.

Para a realização do ensaio de MTS, foram plaqueadas 10^4 e 10^3 células da linhagem H295R e da cultura T179, respectivamente, tanto pLKO.1 quanto shRNA em placas de 96 poços. Para quantificação, foram adicionados 20 µL do reagente em 100 µL de meio de cultura em cada poço da placa contendo as células. Após 4 horas a reação foi quantificada por absorbância em 490 nm utilizando um leitor de placa de 96 poços (Absorbance Microplate Reader ELx800, Bio Tek Instruments Inc., USA). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as leituras foram realizadas 24, 48, 72 e 96h após o plaqueamento das células.

3.4.6 Quantificação do DNA através de citometria de fluxo

As células referidas como PMAH-não mutadas e silenciadas para o gene *ARMC5* foram plaqueadas ($5x10^4$ células/poço) em placas de 6 poços (BD Falcon), e após 48 horas foram fixadas em etanol 70%, coradas com *Hoescht* (1:2000 em PBS) e estocadas a 4°C protegidas da luz. As células foram posteriormente centrifugadas (1000g / 10 min), ressuspensas em PBS e analisadas em citômetro de fluxo (BD LSRFORTESSA X-20, BD *Biosciences*, US) ou analisadas pelas imagens geradas pelo InCell Analyzer Software (GE Electronics).

3.5 Hiperexpressão do gene *ARMC5* - plasmídeos utilizados para transfecção transiente nas culturas de células

Para hiperexpressão do *ARMC5,* foi utilizado um plasmídeo comercial contendo o vetor para expressão do *ARMC5* (pCMV6-Myc-ARMC5; Origene) e como controle foi utilizado o vetor vazio, pCMV6-Myc, obtido em nosso laboratório.

As bactérias foram transformadas por choque térmico e para amplificação dos plasmídeos, foi utilizado um volume de 100μL de bactéria competente *E. coli* (DH5α) e 100ng de DNA plasmideal. As bactérias foram, então, semeadas em uma placa p100 com LB ágar com o antibiótico próprio para cada plasmídeo (50μg/mL) *overnight* a 37°C*.* Em seguida, foi coletada uma colônia isolada para crescimento em 100 mL de meio LB com antibiótico *overnight* sob agitação constante (150 RPM) a 37°C. Os plasmídeos foram extraídos com o *Chargeswitch® Pro Filter Plasmid Maxi Kit* (Life Technologies, CA, USA) e quantificados por espectrometria. Para verificar a integridade e o tamanho do DNA extraído, os plasmídeos foram analisados em gel de agarose a 0.8%. As alíquotas de bactéria competente foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, do Departamento de Microbiologia do ICB-USP.

Ensaios de transfecção transiente para hiperexpressão do *ARMC5*

Para determinar a confluência ideal para transfectar as células H295R e culturas de PMAH carreadoras e não carreadoras de mutação no gene *ARMC5*, estas foram plaqueadas em densidades diferentes ($4x10^5$, $5x10^5$, $6x10^5$, $7x10^5$) em placa de 24 poços, e transfectadas com um plasmídeo pmaxGFP, na proporção 100μL de meio sem soro, 6μL de *Turbofect* (Thermo Scientific, MAS, USA) e 1μg de DNA plasmideal. A transfecção mais eficiente foi a realizada com $5x10^5$ células

H295R após verificação da expressão da proteína GFP em microscópio de fluorescência invertido. Dessa forma foi estabelecido, o seguinte protocolo: 24 h após o plaqueamento de $5x10^5$ células em placa *multiwell* de 24 poços, foi adicionado o complexo de transfecção, formado por 100μL de meio sem soro, 6μL de *Turbofect* e 1μg de DNA plasmideal durante 5 horas. Após esse período, o meio de cultura foi trocado e 24h após a transfecção foi realizada extração de RNA total e de proteínas, de acordo com os protocolos descritos anteriormente.

3.5.1 Análise de viabilidade após hiperexpressão do gene *ARMC5*

Após a transfecção as células foram tratadas com tampão *Annexin-binding* (25nM HEPES, 140mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7.4, 0.1% BSA), 50μL de Alexa Fluor-488 Anexina V, 5μL de 100μg/mL de Iodeto de Propídeo e 5μL de Hoescht para um volume final de 1mL. A obtenção das imagens seriadas em tempo real durante 48h após a transfecção com vetor vazio e contendo *ARMC5* foi realizada através do software *InCell Analyser* 2200 (GE Healthcare, Freiburg, Germany). As quantificações de viabilidade celular foram realizadas 24h após a transfecção através do equipamento *Countess II FL Automated Counter* (Life Technologies, MAS, USA), através da incubação com o corante *Trypan Blue* (Life Technologies, MAS, USA; 1:1), onde as células coradas foram consideradas inviáveis. Foram realizadas contagens também de células em apoptose e necrose, através da marcação com Hoescht, Anexina V e Iodeto de Proídeo (Life Technologies, MAS, USA), onde as células marcadas com Hoescht foram consideradas viáveis, aquelas marcadas apenas com Anexina V e Hoescht foram consideradas em apoptose precoce, aquelas marcadas com Iodeto de Propídeo foram consideradas em

necrose e aquelas marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídeo foram consideradas em apoptose tardia.

3.5.2 qPCR array de genes relacionados à apoptose celular

Os fragmentos obtidos das células PMAH *ARMC5*-mutadas foram transfectados por 5, 24 e 48 horas com o vetor pCMV6-Myc-ARMC5, contendo o gene *ARMC5,* e com o vetor vazio, conforme descrito acima. O RNA total das células foi extraído utilizando o Trizol®, como descrito anteriormente, e o cDNA foi sintetizado a partir de 500ng de RNA total utilizando o kit RT^2 *First Strand* (SABiosciences, Qiagen Company). A reação foi realizada no equipamento ABI 7500 *Real Time PCR Systems* (Applied Biosystems®, CA, USA), cujos parâmetros para a reação foram 1 ciclo a 95°C por 10 min., seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 min. Os resultados das reações foram analisados automaticamente pelo programa do equipamento para determinação do limite mínimo das amplificações, conforme instruções do fabricante. Os dados foram analisados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para obtenção da quantificação relativa de cada gene analisado em relação ao controle de cada experimento, de acordo com o melhor gene endógeno. O cDNA foi utilizado em placas RT^2 Profiler PCR *array Apoptosis* (Qiagen, PAHS-020Z), de acordo com as instruções do fabricante. As placas contêm 84 poços com *primers* específicos para os genes de interesse, 5 poços com genes endógenos, 1 poço de controle para DNA genômico, 3 poços referentes ao controle da transcriptase reversa e 3 poços para controle positivo da placa. As análises e a posterior plotagem dos dados foram realizadas utilizando a ferramenta *online* disponibilizada pela Qiagen denominada de *RT2 Profiler PCR Array Data Analysis* 3.5 (SABiosciences, Qiagen).

3.6 Ativação do gene *ARMC5* através de CRISPR dCas9

3.6.1 Produção de lentivirus

A produção das partículas lentivirais foi realizada no laboratório do Prof. Dr. Hugo Armelin (Instituto Butantan). Foram produzidos três sobrenadantes virais diferentes a partir de plasmídeos com vetores lentivirais, sendo eles: 1) lenti dCas9-VP64 (addgene 61425), que consiste em um plasmídeo contendo uma ucleasse desativada, dCas9 e que apresenta resistência à blasticidina; 2) lenti MS2-P65-HSF1 (addgene 61426), que, junto com a dCAs9, recrutará fatores de transcrição endógenos para permitir a transcrição gênica, e apresenta resistência à higromicina; e lenti sgRNA (addgene 61427), que carrega a sequência guia (sgRNA) para o gene de interesse, geralmente antes do sítio de transcrição, e apresenta resistência à zeocina. As sequências PAM, de 20pb, utilizadas estão apresentadas na Tabela 1. Os plasmídeos foram transfectados com Lipofectamina (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) em células empacotadoras HEK293FT, que produziram e secretaram as partículas virais para o meio de cultura. Esse meio foi recolhido, filtrado e armazenado a -80°C. A produção foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Sanjana e colaboradores (45).

Tabela 5 – Sequências guias.

ID	Sequência dos guias	TSS*
A1	ACCAGCACAGTCACAAAGTC	107
A2	ACCACCAAGCATCAGGTTTC	129
A3	TTCTTCACTCGCAGCGCAGT	156
Scramble	GCACTACCAGAGCTAACTCA	-

*distância até o sítio de transcrição em pb

3.6.2 Transdução viral para ativação endógena do gene *ARMC5* utilizando o sistema CRISPR-dCas9

As células H295R ($3x10^4$/poço) foram plaqueadas em *multiwell* de 24 poços, por 24h. Após esse período, o meio foi descartado e foram adicionados 1mL do Meio RPMI puro (Gibco) e 1mL do sobrenadante viral. Após 24h da transdução, as células foram selecionadas com o respectivo antibiótico, quando somente as células estavelmente transduzidas sobreviveram. Conforme mencionado acima, as transduções foram feitas de forma seriada, ainda de acordo com o protocolo descrito em Sanjana e colaboradores (45).

3.6.3 Curva de crescimento e MTS

As curvas de crescimento e os ensaios de viabilidade MTS foram realizados como anteriormente descritos.

3.7 Análise estatística

Para analisar a significância na diferença de expressão dos genes estudados entre as culturas analisadas foi utilizado o teste ANOVA, seguido do pós-teste Dunnett, onde $*p<0.05$; $**p<0.01$; $***p<0.001$. Para os experimentos de transdução viral e transfecção foi utilizado o teste t (pareado), sendo que a diferença foi considerada quando $p<0.05$, utilizando o programa *GraphPad Prism* 6.

4. Resultados

4.1 Pacientes

As culturas de células foram obtidas de 13 pacientes não relacionados com idade média de 58.3 ± 8.8 anos, cujos dados clínicos são apresentados na Tabela 1. O diagnóstico de SC manifesta (10/13) e SC subclínica (3/13) foi realizado de acordo com dados clínicos e laboratoriais. A apresentação clínica heterogênea dos pacientes, independente da presença de mutações, é uma característica que representa a PMAH, no entanto, observamos que nos pacientes carreadores de mutação do *ARMC5*, as concentrações de ACTH plasmático encontram-se mais

frequentemente supressos e os valores do cortisol pós dexametasona, mais altos, como apresentando na Figura 5.

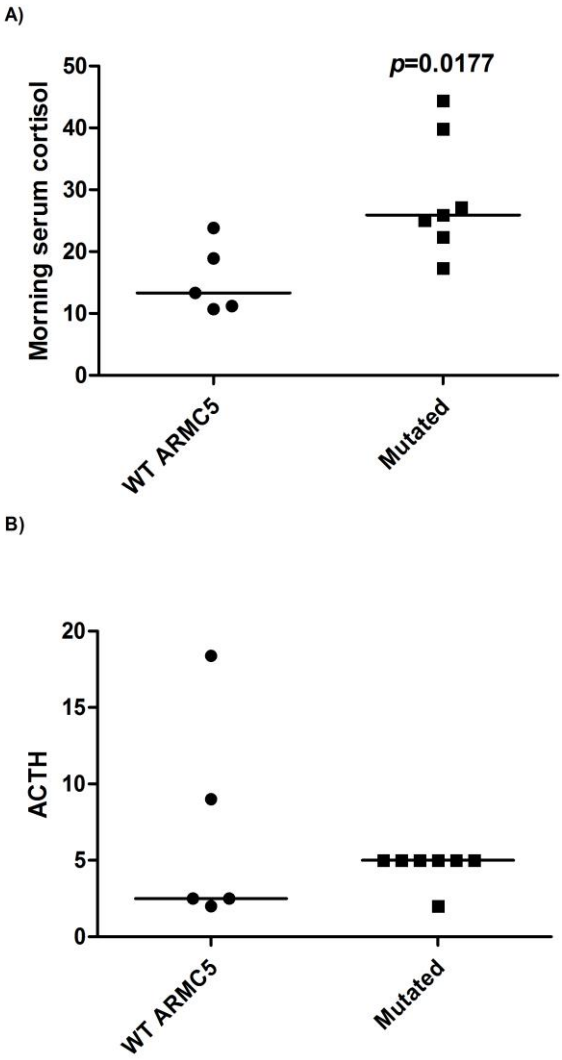

Figura 5 – Concentrações de cortisol (A) e ACTH (B) em pacientes portadores ou não de mutações no gene *ARMC5.* WT = *wild type* (não mutado)

4.2 Caracterização das culturas de células provenientes de nódulos de PMAH

A Figura 6 ilustra as culturas de células obtidas neste estudo além da linhagem H295R e de uma cultura de adrenal humana normal. É possível observar a morfologia homogênea das células provenientes de fragmentos de hiperplasia macronodular, a presença de células esteroidogênicas (apontadas pelas setas

brancas), assim como áreas que se assemelham a regiões de formação de nódulos (apontadas pelas setas pretas).

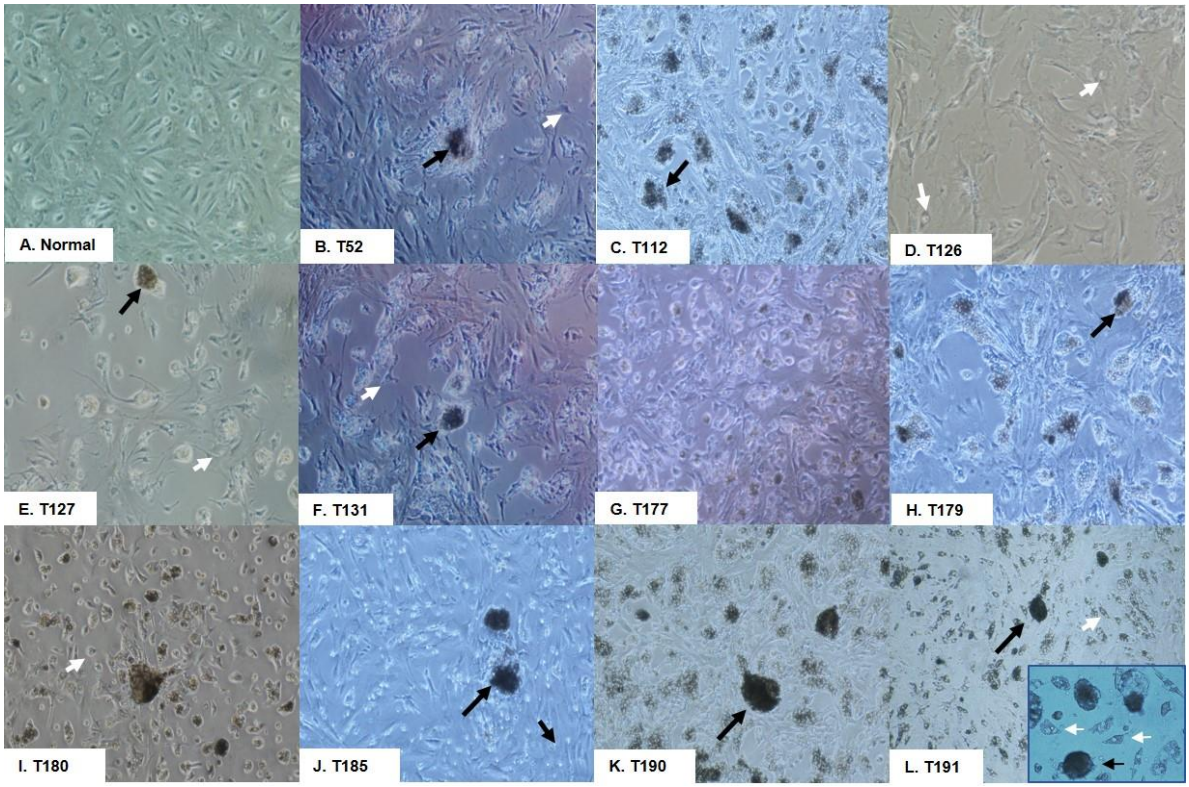

Figura 6 – Fotomicrografia representativa das culturas de células Adrenal Normal (A), T52M (B), T112M (C), T126M (D), 127M (E), T131M (F), T177M (G), T179NM (H), T180NM (I), T185NM (J), T190NM (K) e T191M (L). Presença de células esteroidogênicas representadas pelas setas brancas e regiões de formação de nódulos, pelas setas pretas.

4.3 Análise funcional das culturas de células da hiperplasia utilizando a coloração por Oil Red O

Através da coloração *Oil Red O* foi observada a presença de gotículas lipídicas no citoplasma da linhagem de carcinoma adrenocortical, células H295R, utilizada como controle, e nas culturas de células de hiperplasia macronodular primária, carreadoras ou não de mutações no gene *ARMC5* (Figura 7).

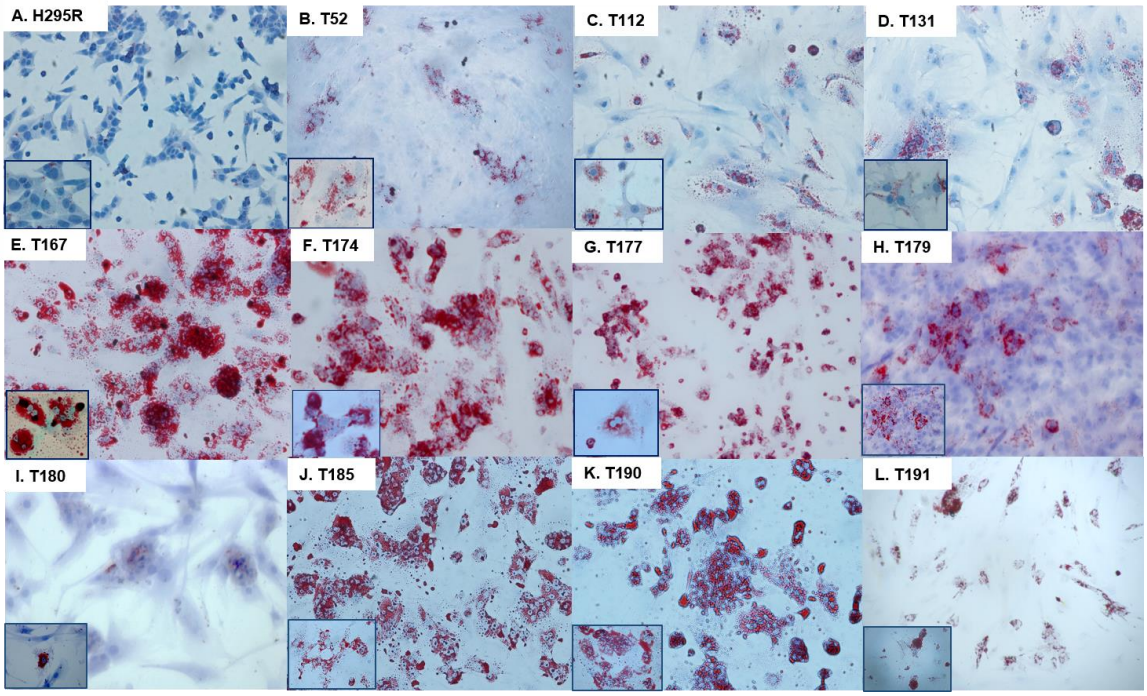

Figura 7 – Fotomicrografia representativa das culturas utilizadas: H295R (A), T52M (B), T112M (C), T131M (D), T167M (E), T174M (F), T177M (G), 179NM (H), T180NM (I), T185NM (J), T190NM (K) e T191M (J) demonstrando a presença de gotículas lipídicas no citoplasma das células.

É possível observar que a presença de gotículas lipídicas no citoplasma celular, bem como a quantidade na qual estas se apresentam, ocorrem independentemente de mutações no *ARMC5.* Utilizando essa caraterística como parâmetro observou-se que após a 4ª passagem há uma diminuição expressiva do número de gotículas lipídicas, o que sugere perda das características esteroidogênicas das culturas. Por esse motivo as células de PMAH foram utilizadas até a 4ª passagem.

4.4 Sequenciamento do gene *ARMC5*

Foi realizado o sequenciamento do material extraído das 13 culturas de células utilizadas neste estudo. As mutações germinativas foram primeiramente identificadas no sangue dos pacientes, seguido do tecido do nódulo adrenal e posteriormente das células provenientes das culturas celulares de PMAH.

Na Figura 8 podemos observar um exemplo de eletroferograma utilizado para leitura do sequenciamento automático do DNA genômico extraído das culturas de células de PMAH.

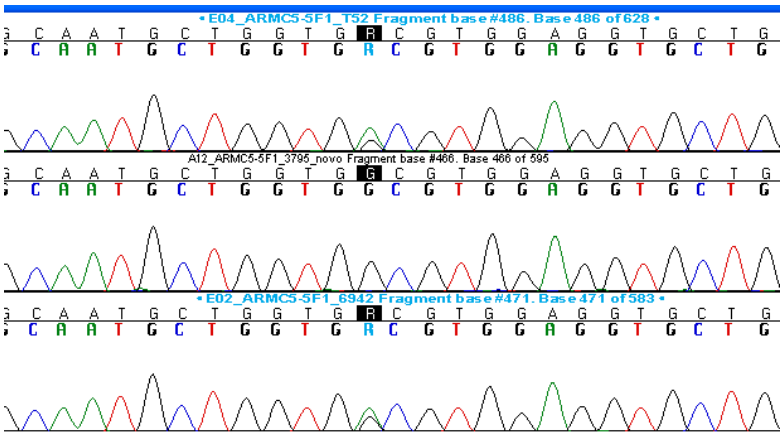

Figura 8 – Eletroferograma representativo da mutação germinativa c.968G>A, p. Gly323Asp (heterozigose), na cultura T52M, correspondente à mutação encontrada no material extraído do sangue e da cultura de células da paciente.

Dentre as 13 amostras analisadas de culturas celular de PMAH, foram identificadas mutações germinativas no gene *ARMC5* em 8 amostras. Destas, foram identificados segundos eventos ou perda de heterozigose (LOH) em 5 culturas de células.

Além disto, os segundos eventos identificados no DNA extraído dos nódulos foram os mesmos observados no DNA extraído das culturas celulares, o que sugere que as culturas são representativas do material proveniente dos pacientes analisados. Nas outras cinco amostras de culturas de células de PMAH analisadas para este estudo não foram identificadas mutações no gene *ARMC5,* como demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5 – Mutações identificadas no DNA extraído das culturas de células de PMAH, do tecido adrenal dos pacientes e do sangue periférico dos pacientes com PMAH.

	CULTURA CELULAR		TECIDO ADRENAL		SANGUE
	Germinativa	**Somática**	**Germinativa**	**Somática**	**Germinativa**
T52	exon 3: c.968G>A, p.Gly323Gly	-	exon 3: c.968G>A, p.Gly323Gly	-	exon 3: c.968G>A, p.Gly323Gly
T112	exon 1: c.170_171insG, p.I58Nfs*45	LOH	exon 1: c.170_171insG, p.I58Nfs*45	LOH	exon 1: c.170_171insG, p.I58Nfs*45
T126	exon 3: c.1158G>A; p.Trp386*	LOH	exon 3: c.1158G>A; p.Trp386*	LOH	exon 3: c.1158G>A; p.Trp386*
T127	exon 2: c.476 - 1G>C	exon 6: c.2053_2055delCTT, p.del685Leu	exon 2: c.476 - 1G>C	exon 6: c.2053_2055delCTT, p.del685Leu	exon 2: c.476 - 1G>C
T131	exon 6: c.2423A>C, p.His808Pro	exon 1: c.283_295delTCGGCCGCGTCGGG p.Ser95Serfs*2	exon 6: c.2423A>C, p.His808Pro	exon 1: c.283_295delTCGGCCGCGTCGGG p.Ser95Serfs*2	exon 6: c.2423A>C, p.His808Pro
T167	exon 4: c.1864+250C>T, rs11150624	exon 2: c.543_544insA; p.Ala182Serfs*5	exon 4: c.1864+250C>T, rs11150624	exon 2: c.543_544insA; p.Ala182Serfs*5	exon 4: c.1864+250C>T, rs11150624
T177	exon 3: c.799C>T, p.Arg267*	-	exon 3: c.799C>T, p.Arg267*	-	exon 3: c.799C>T, p.Arg267*
T179	NM	NM	NM	NM	NM
T180	NM	NM	NM	NM	NM
T185	NM	NM	NM	NM	NM
T188	NM	NM	NM	NM	NM
T190	NM	NM	NM	NM	NM
T191	exon 4: c.1094T>C, p.Leu365Pro	-	exon 4: c.1094T>C, p.Leu365Pro	-	exon 4: c.1094T>C, p.Leu365Pro

Não mutada = NM

4.5 Análise da expressão dos genes *ARMC5*, *3BHSD2* e *CYP17A1* nas culturas celulares de PMAH

A expressão do mRNA do *ARMC5* e das enzimas esteroidogênicas foi analisada nas culturas de PMAH, com ou sem mutações, por qPCR, como mostrado na Figura 9.

A expressão do RNAm do *ARMC5* foi significantemente maior em 3 culturas de células (T179NM, 180NM e T191M) quando comparadas a um *pool* comercial de adrenal normal (Figura 9A). Como demonstrado na Figura 9B e 9C, observamos que a expressão do mRNA das enzimas *HSD3B2* e *CYP17A1* foi menor nas culturas de PMAH do que na adrenal normal, independente da presença de mutações no gene *ARMC5.*

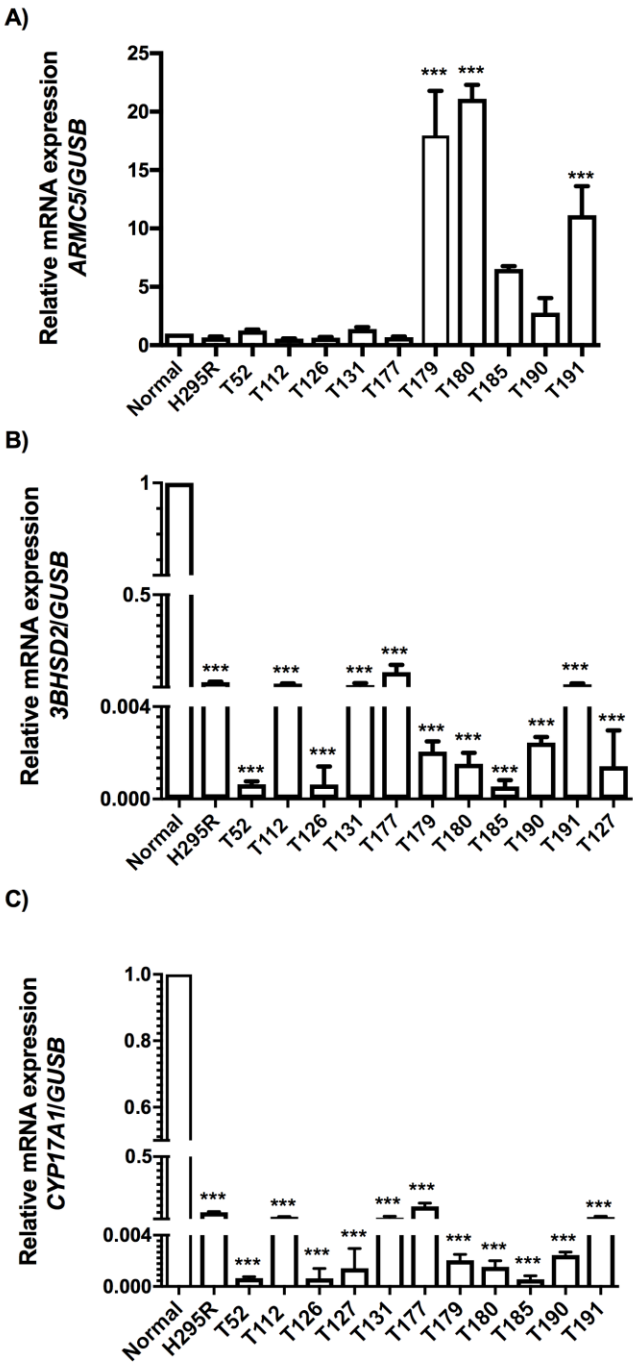

Figura 9 – Expressão do mRNA dos genes *ARMC5* (A), *3BHSD2* (B) e *CYP17A1* (C) no *pool* de adrenal normal, na linhagem H295R e nas culturas de PMAH.

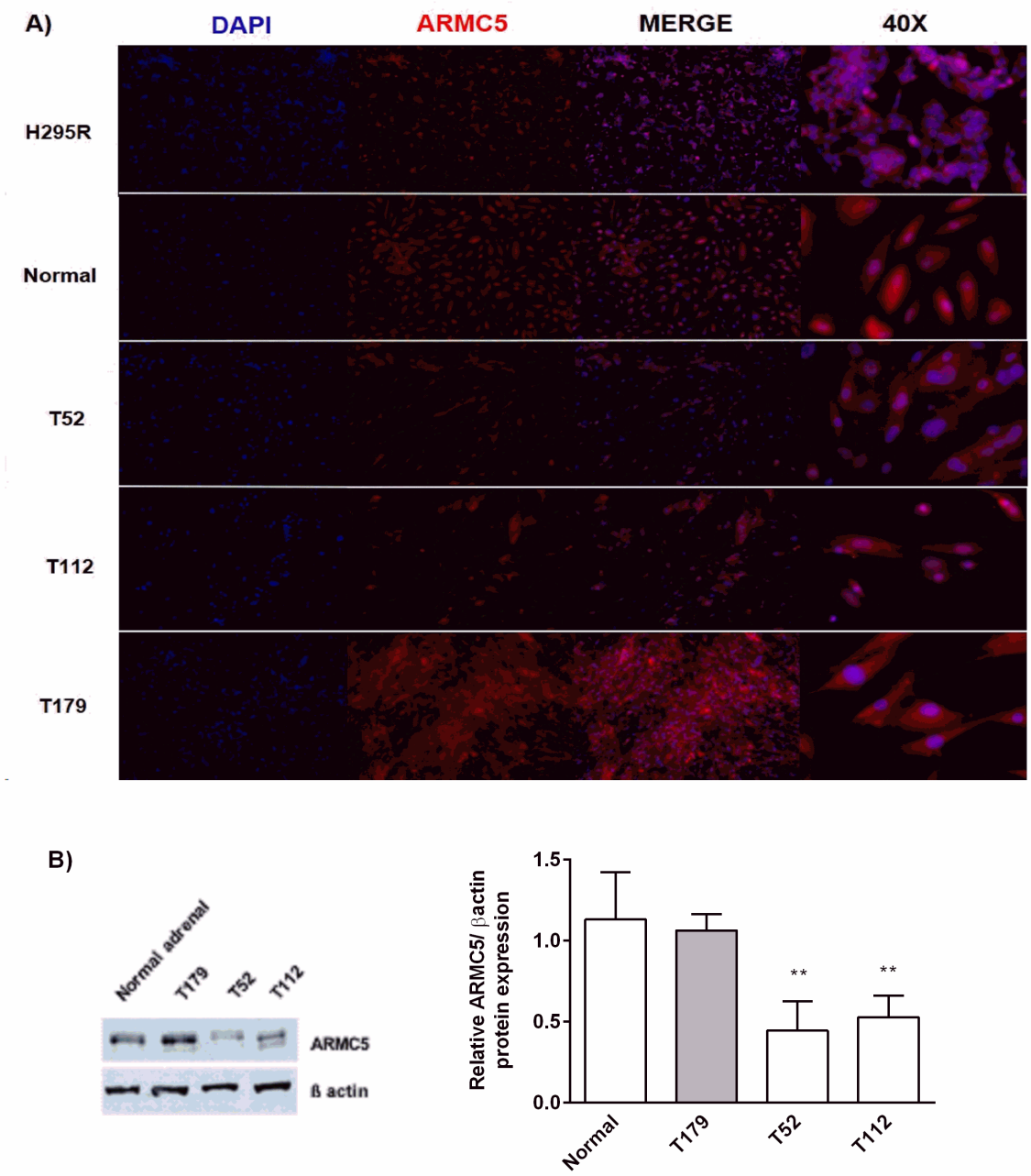

Figura 10 – A. Localização da proteína ARMC5 em células da linhagem H295R e em culturas de PMAH, mutadas (T112M e T52M) e não mutada (T179NM); B. Expressão relativa da proteína ARMC5 na cultura de adrenal normal e nas culturas de PMAH.

Como apresentado nas Figura 9 e 10, as culturas de células de PMAH provenientes de pacientes nos quais não foi detectada mutação no gene *ARMC5,* de forma geral, apresentaram expressão maior do gene e da proteína ARMC5 quando comparada às culturas com mutação e às células da linhagem H295R e células da adrenal normal. Além disto, é possível observar que a expressão da

proteína ARMC5 é predominantemente citoplasmática, independentemente do tipo celular analisado.

4.6 Análise da expressão de receptores ectópicos acoplados à proteína G

Foi analisada a expressão de receptores ectópicos, isto é, aqueles que não estão presentes no córtex adrenal normal, como o receptor de vasopressina 2 (*AVPR2*) e o receptor inibitório gástrico (*GIPR*) ou receptores eutópicos aberrantemente expressos, mais encontrados e descritos na PMAH, como o receptor de serotonina do tipo 5 (*5HTR4*) e o receptor de vasopressina 1A (*AVPR1a*). Observamos que todas as culturas de células de PMAH expressaram os receptores simultaneamente (Figura 10), sendo esta condição independente da presença de mutações no gene *ARMC5.*

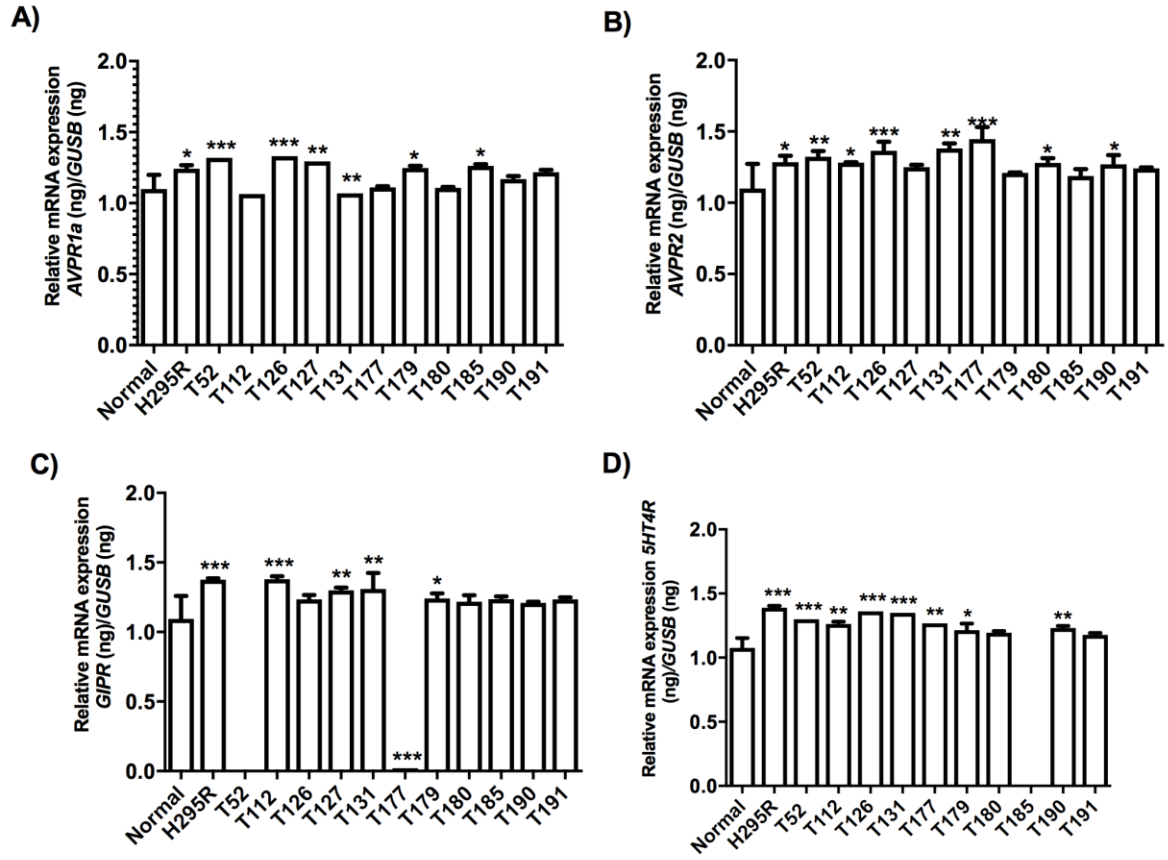

Figura 11 – Expressão relativa do mRNA dos genes *AVP1aR* (A)*, AVP2R* (B)*, 5HT4R* (C) e *GIPR* (D) no pool de adrenal normal, na linhagem H295R e nas culturas de PMAH.

4.7 Análise da expressão dos genes *POMC* e *MC2R*, e da presença de ACTH intra-adrenal

Uma vez que foi evidenciado por Louiset e cols (17) que amostras de tecido de hiperplasias apresentavam expressão do gene *POMC* menor do que na adrenal normal, e a expressão do ACTH em *clusters* de células, buscamos analisar se as culturas obtidas expressavam esta proteína. Primeiramente, analisamos a expressão relativa do precursor do ACTH, o gene *POMC,* como demonstrado na Figura 12A.

Com o intuito de verificar se o ACTH poderia ser ativo nas células, analisamos também o seu receptor, MC2R. Observamos que a expressão do RNAm do *MC2R* foi muito heterogênea entre as culturas de células analisadas e inferior ao *pool* de adrenal normal, independentemente da presença de mutações no gene *ARMC5,* como demonstrado na Figura 12B.

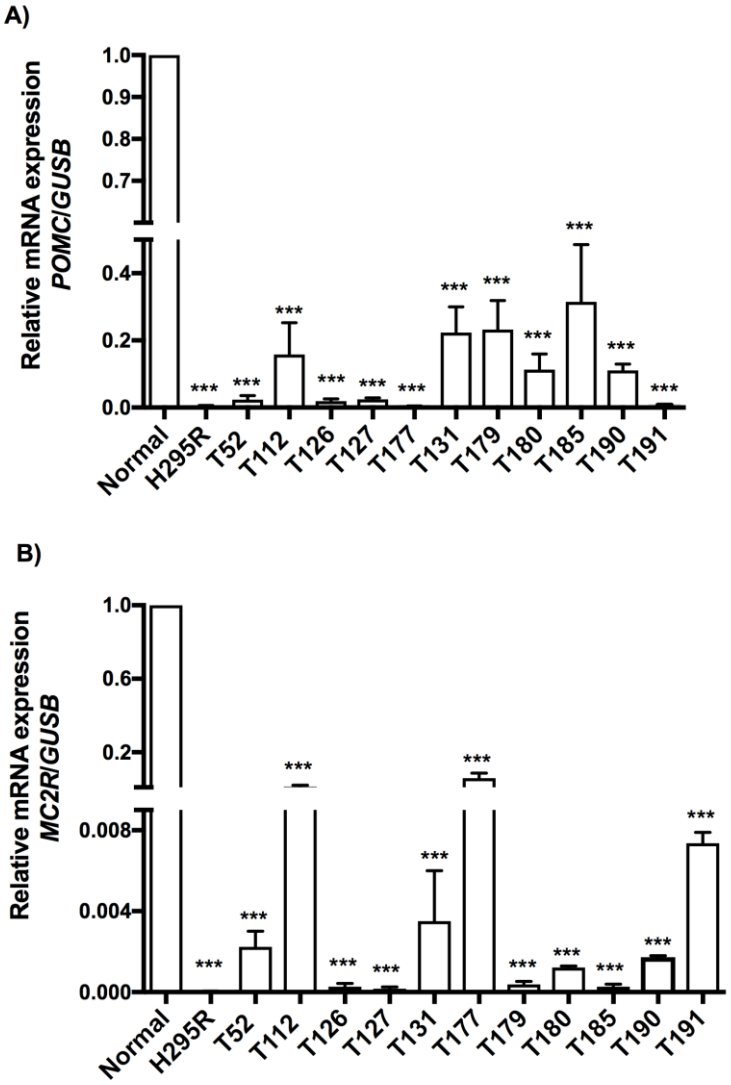

Figura 12 - Expressão relativa do mRNA do gene *POMC* (A) e *MC2R* (B) no *pool* de adrenal normal, na linhagem H295R e nas culturas de células de PMAH.

Neste estudo foi também observada a presença do mRNA do gene *PCSK1,* que codifica a pro-hormônio convertase do tipo 1, que é responsável por clivar a POMC para produzir o ACTH, como demonstrado na Figura 13A. Observamos também que as células provenientes de nódulos de PMAH apresentaram ACTH ectópico no citoplasma, de forma esparsa e em *clusters*, como demonstrado na Figura 13B. Vale ressaltar que as células foram ACTH positivas tanto em células de culturas que apresentaram mutação no gene *ARMC5* quanto nas que não apresentam.

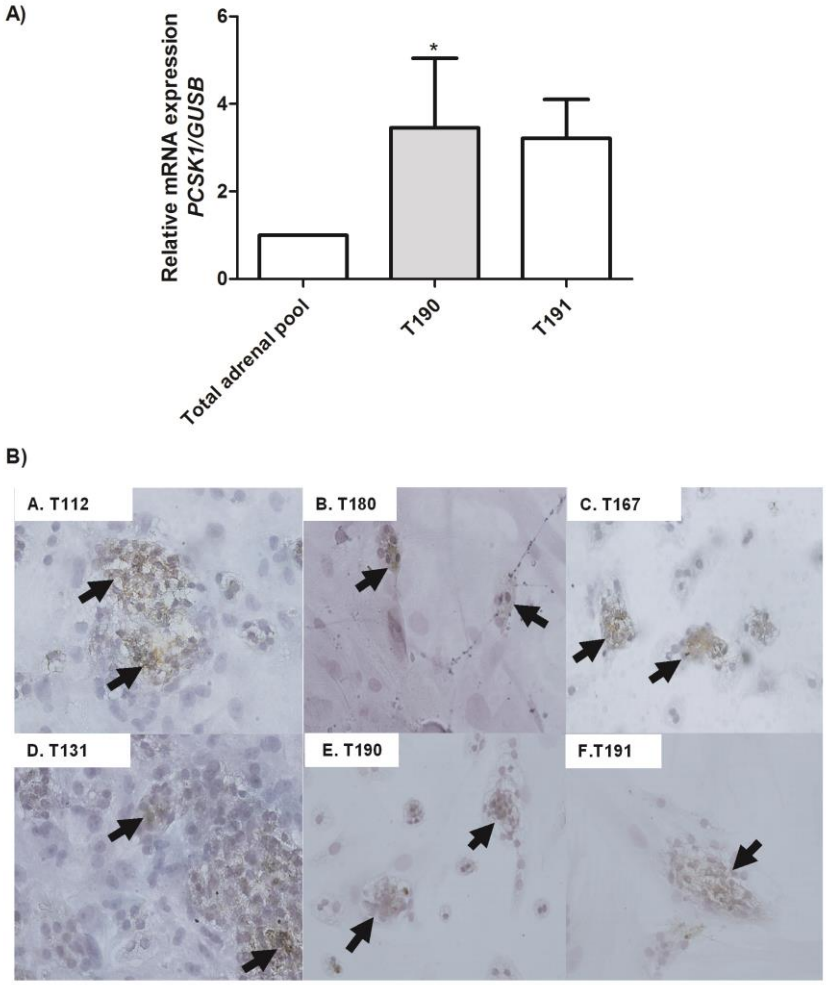

Figura 13 – A) Expressão do mRNA do gene *PCSK1* no *pool* de adrenal total e em culturas de células de PMAH, T190NM e T191M; B) Fotomicrografia representativa (20x) da expressão proteica de ACTH intra-adrenal na cultura T112M (A), T180NM (B), T167M (C), T131M (D), T190NM (E), T191M (F).

Com estes resultados, demonstramos que as culturas de células de PMAH apresentaram expressão heterogênea do gene *ARMC5,* com uma tendência a ser maior nas culturas não portadoras de mutações do que nas culturas mutadas. Além disto, não foram observadas diferenças morfológicas ou no crescimento das culturas de células com ou sem mutações.

O acúmulo de gotículas lipídicas no citoplasma das células de PMAH, a expressão de *CYP17A1, 3BHSD2* e de *MC2R* caracterizam a presença de células esteroidogênicas e representatividade tanto de células espongiformes quanto de

células compactas dos nódulos de PMAH. Não sabemos, no entanto, se essa condição é momentânea ou permanente.

4.8 Análise da resposta esteroidogênica da cultura de células de PMAH, T190NM, ao ACTH, AVP e à FK

Com o intuito de caracterizar funcionalmente as culturas de PMAH, estimulamos as células T190NM com ACTH, AVP e FK. Quando tratadas por 2h com ACTH 10^{-7}M e FK 10^{-6}M as células apresentaram aumento significante da expressão do mRNA do gene *POMC, 3BHSD2* e *StAR* (Figura 14A). Após 6h (Figura 14C), as células tratadas apresentaram aumento significante dos genes relacionados com maquinaria esteroidogênica e do *MC2R*, no entanto, não mais do mRNA de *POMC*. Após 48h, observamos aumento na síntese de cortisol, como pode ser observado na Figura 14D. No entanto, não houve aumento da expressão dos genes estudados em função do tempo após tratamento com AVP 10^{-8}M. Para investigar o possível envolvimento da via PKA na regulação positiva no gene *POMC* através do estímulo do ACTH, as células de PMAH foram tratadas com H89, inibidor específico de PKA. Observamos que o H89, além de inibir a via esteroidogênica, diminuiu a transcrição do gene *POMC* induzida pelo ACTH, como demonstrado na Figura 14B.

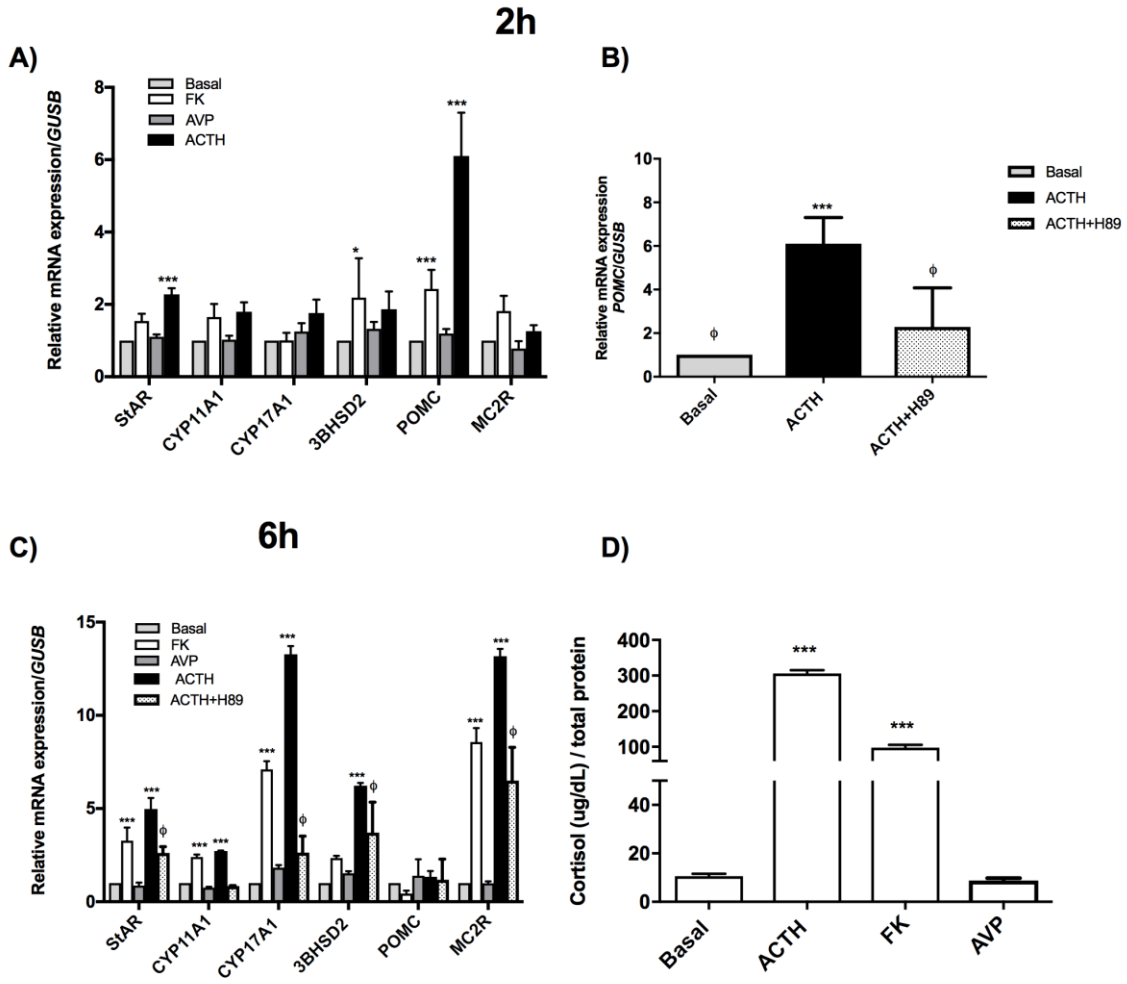

Figura 14 - Expressão relativa dos genes *StAR, CYP11A1, CYP17A1, 3BHSD2, MC2R* e *POMC* nas células da cultura de PMAH T190NM, após o tratamento com FK, AVP, ACTH, ACTH +H89 durante 2h (A) e 6h (C) e produção de cortisol após 48h (D). Expressão do gene *POMC* após tratamento com ACTH e ACTH+H89 por 2h (C).

Observamos também que as células T191M - cultura de PMAH carreadora de mutação germinativa no gene *ARMC5* - apresentaram aumento do número de *clusters* de células ACTH-positivas após 24h de estímulo com ACTH, como apresentado na Figura 15.

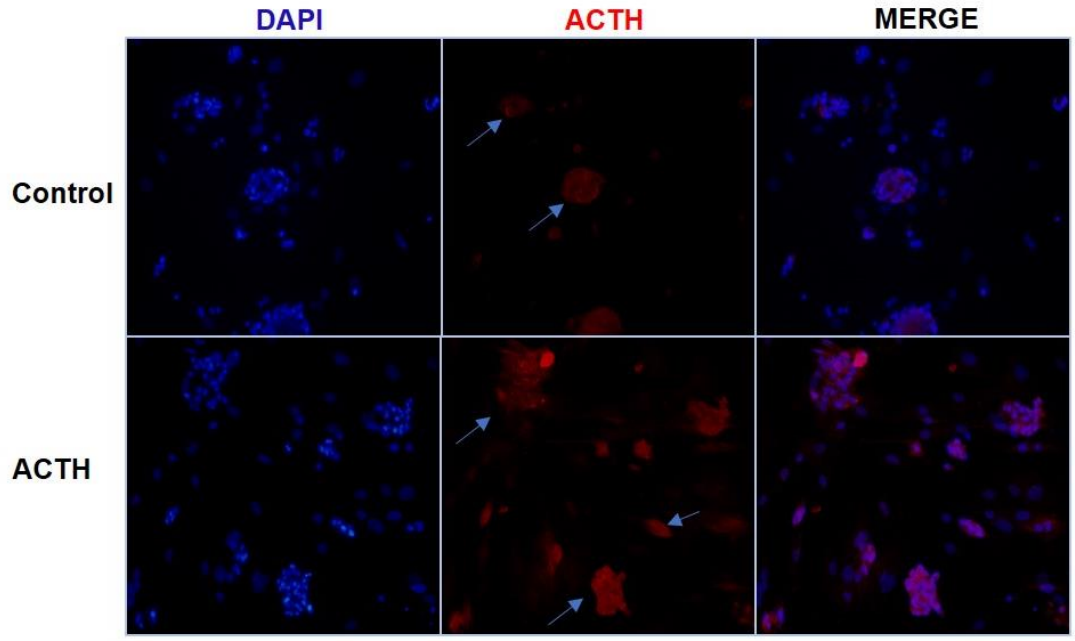

Figura 15 – Fotomicrografia representativa da presença de ACTH através de imunofluorescência na cultura de células de PMAH, T191M. Na linha superior está demonstrado o controle e na linha inferior, após 24h de tratamento com ACTH (20x).

Com estes resultados, demonstramos pela primeira vez que a ação do ACTH induz a expressão de seu precursor, o gene *POMC,* em células de PMAH, e que este mecanismo é regulado pela via PKA.

4.9 Estudo funcional do *ARMC5* nas culturas de PMAH

4.9.1 Silenciamento do *ARMC5*

Validação dos métodos de transdução viral para *knockdown* do gene *ARMC5* e da transfecção transiente para sua hiperexpressão

Para validar o protocolo de transdução viral, transfecção transiente e testar sua eficiência, primeiramente realizamos os experimentos em linhagens HEK293T e H295R.

- Transdução viral na linhagem HEK293T

Como pode ser observado na Figura 16, os clones 4 e 6 das células HEK293T transduzidas com o shRNA apresentaram expressão significativamente menor (clone 4: *p*=0.001; 64,3% ± 3.5; clone 6: *p*=0.029; 51.9% ± 1.26) do mRNA do gene *ARMC5* quando comparadas ao controle, pLKO.1.

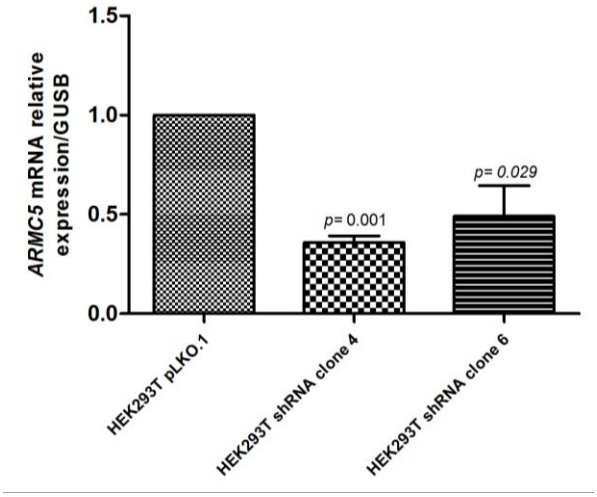

Figura 16 - Expressão relativa do mRNA do gene *ARMC5* na linhagem HEK293T transduzidas com o controle, pLKO.1 e com shRNA.

Silenciamento do *ARMC5* na linhagem H295R

Como pode ser observado na Figura 17A as células H295R transduzidas com o shRNA apresentaram expressão 46 ± 3.9 % menor (*p*=0.0019) de mRNA do *ARMC5*, quando comparadas ao controle, células pLKO.1.

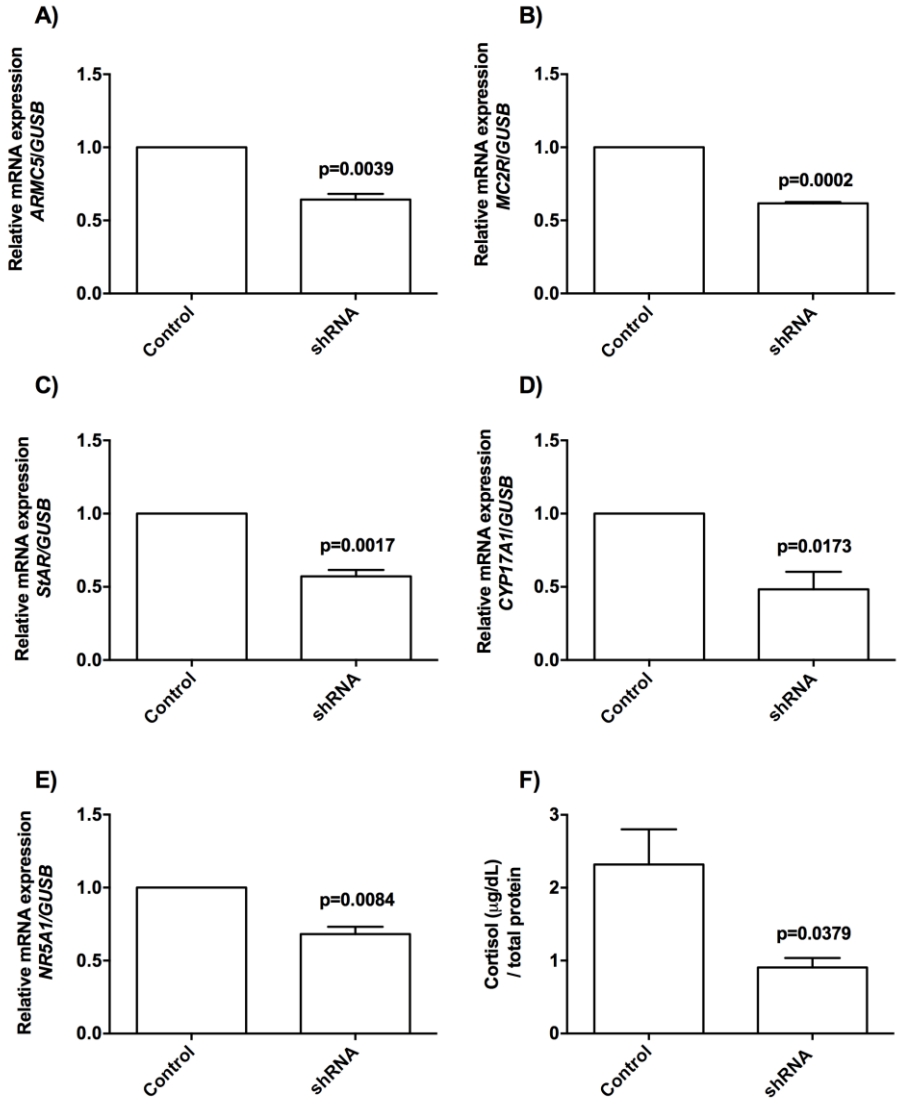

Figura 17 - Expressão relativa do mRNA do *ARMC5* (A) na linhagem de células H295R transduzida com controle e com shRNA, efeitos do silenciamento do *ARMC5* no mRNA de enzimas esteroidogenicas (B, C e D), no fator esteroidogenico, SF-1 (E) e na síntese de cortisol (F).

Uma vez que foi descrito que o silenciamento transiente do gene *ARMC5* leva à diminuição da expressão do *MC2R* e de alguns fatores esteroidogênicos (27), analisamos esses parâmetros nas células H295 silenciadas para o gene *ARMC5*. Observamos que essas células apresentam uma expressão menor do *MC2R* quando comparadas ao controle, pLKO.1. Além da diminuição da expressão do *MC2R,* o silenciamento do gene *ARMC5* levou à diminuição da expressão do mRNA da enzima *CYP17A1*, de *StAR* e do fator esteroidogênico 1 (*SF-1; NR5A1)*, quando

comparado ao controle. No entanto, não observamos diferença significante na expressão da enzima *3BHSD2* (resultado não apresentado). Foi observado também que o silenciamento do *ARMC5* levou à diminuição da síntese de cortisol na linhagem H295R (Figura 17F), o que está de acordo com o que foi descrito na literatura (27).

Estudo funcional do *ARMC5* na cultura de célula de PMAH, células T179

O papel do *ARMC5* na esteroidogênese

Uma vez estabelecidos os protocolos para silenciamento do gene *ARMC5* nas linhagens de células HEK293T e H295R, foi realizado o estudo funcional do *ARMC5* em uma cultura de células de PMAH, T179NM, não carreadora de mutações no *ARMC5*. Por meio das análises por qPCR e *immunoblotting* observamos a diminuição da expressão do mRNA (Figura 18A) e da proteína ARMC5 (Figura 18B) nas células T179NM transduzidas com shRNA.

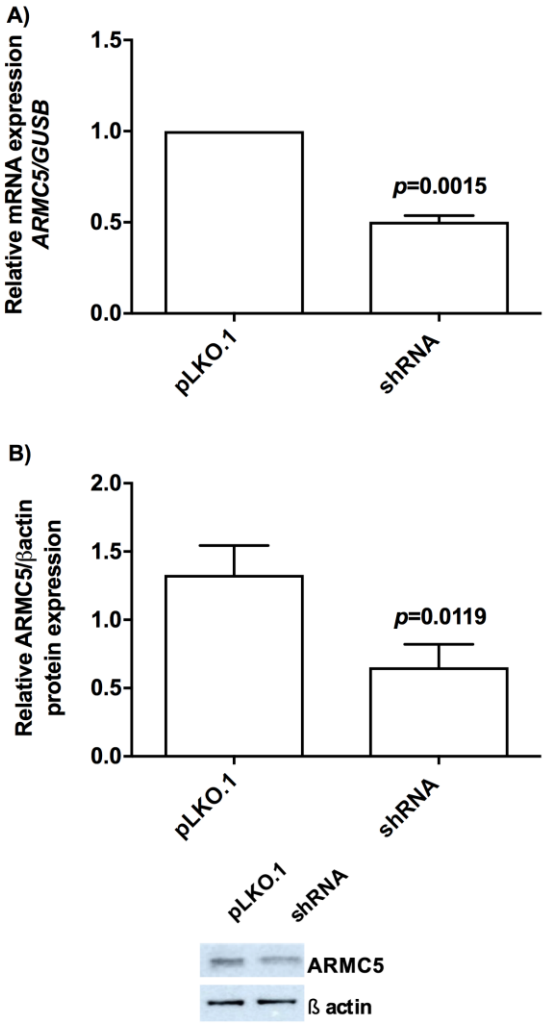

Figura 18 - Silenciamento do mRNA (A) e proteína ARMC5 (B) na cultura de células T179 de PMAH.

O silenciamento do *ARMC5* na cultura de células não carreadora de mutações no gene *ARMC5*, de forma geral, promoveu efeitos negativos em diferentes etapas da via esteroidogênica, pois levou à diminuição do mRNA de *StAR, CYP11A1, CYP17A1, MC2R* e *SF-1*, todos componentes que atuam na síntese do cortisol e/ou na manutenção da glândula adrenal (Figura 19 A-E).

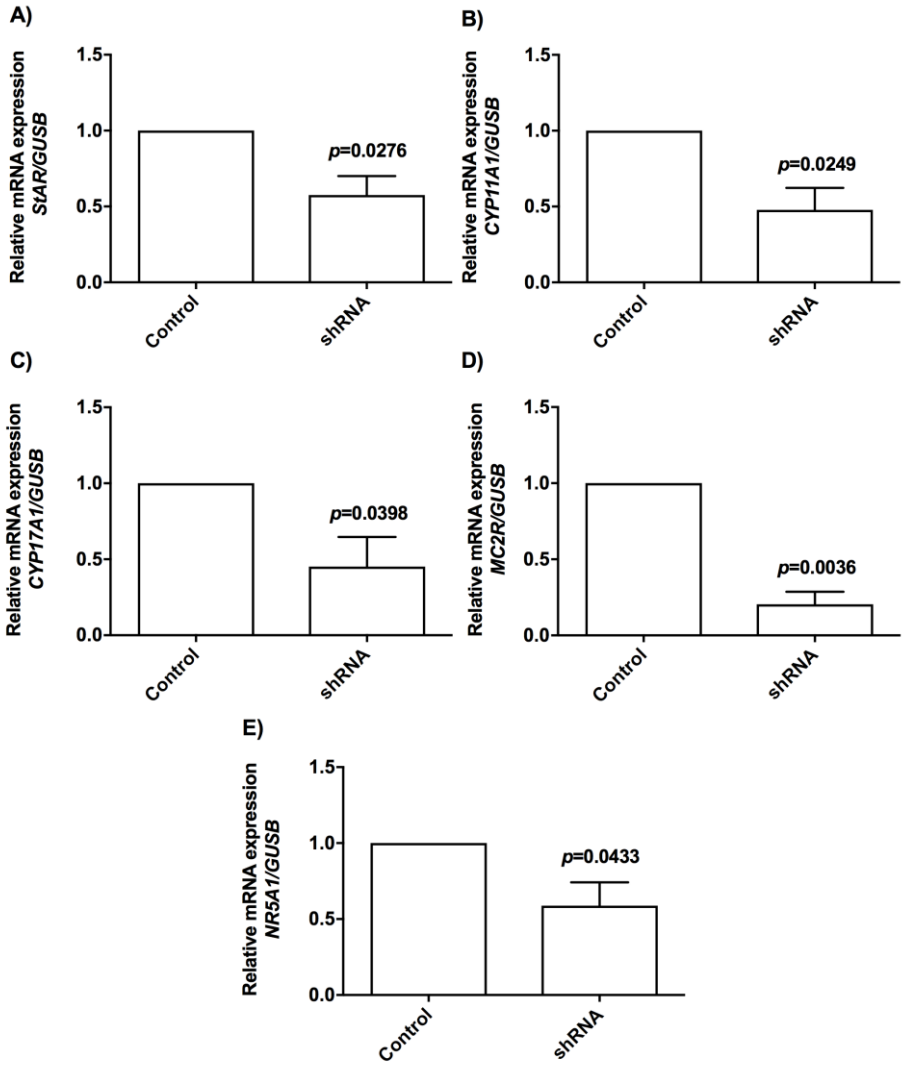

Figura 19 - Efeitos do silenciamento do *ARMC5* no mRNA de enzimas esteroidegênicas (A, B e C), no MC2R (D) e no fator esteroidegênico, SF-1 (E), na cultura de células de PMAH, T179NM, em comparação ao controle.

O papel do *ARMC5* na proliferação e ciclo celular

Considerando que o gene *ARMC5* e seu produto atuem como supressores de tumor, analisamos parâmetros relacionados à proliferação, como a via ERK/MAPK e o gene *CCNE1* (ciclina E). Observamos que as células H295R e T179NM silenciadas para o *ARMC5* não apresentaram ativação/fosforilação da via ERK/MAPK (Figura 20A). No entanto, observamos que ocorre aumento da expressão do gene *CCNE1* (Figura 20B), que regula a progressão da fase G1 para S, o que sugere que *ARMC5* pode desempenhar um papel no controle no ciclo

celular, através de outra via diferente de ERK/MAPK. Além disto, o silenciamento do *ARMC5* não foi suficiente para comprometer a viabilidade celular, como demonstrado na Figura 20C. Finalmente, através da análise das curvas de crescimento observamos que as células H295R e T179NM, silenciadas para o ARMC5 apresentaram um aumento na capacidade proliferativa após, respectivamente, 48h e 96h (Figura 20D).

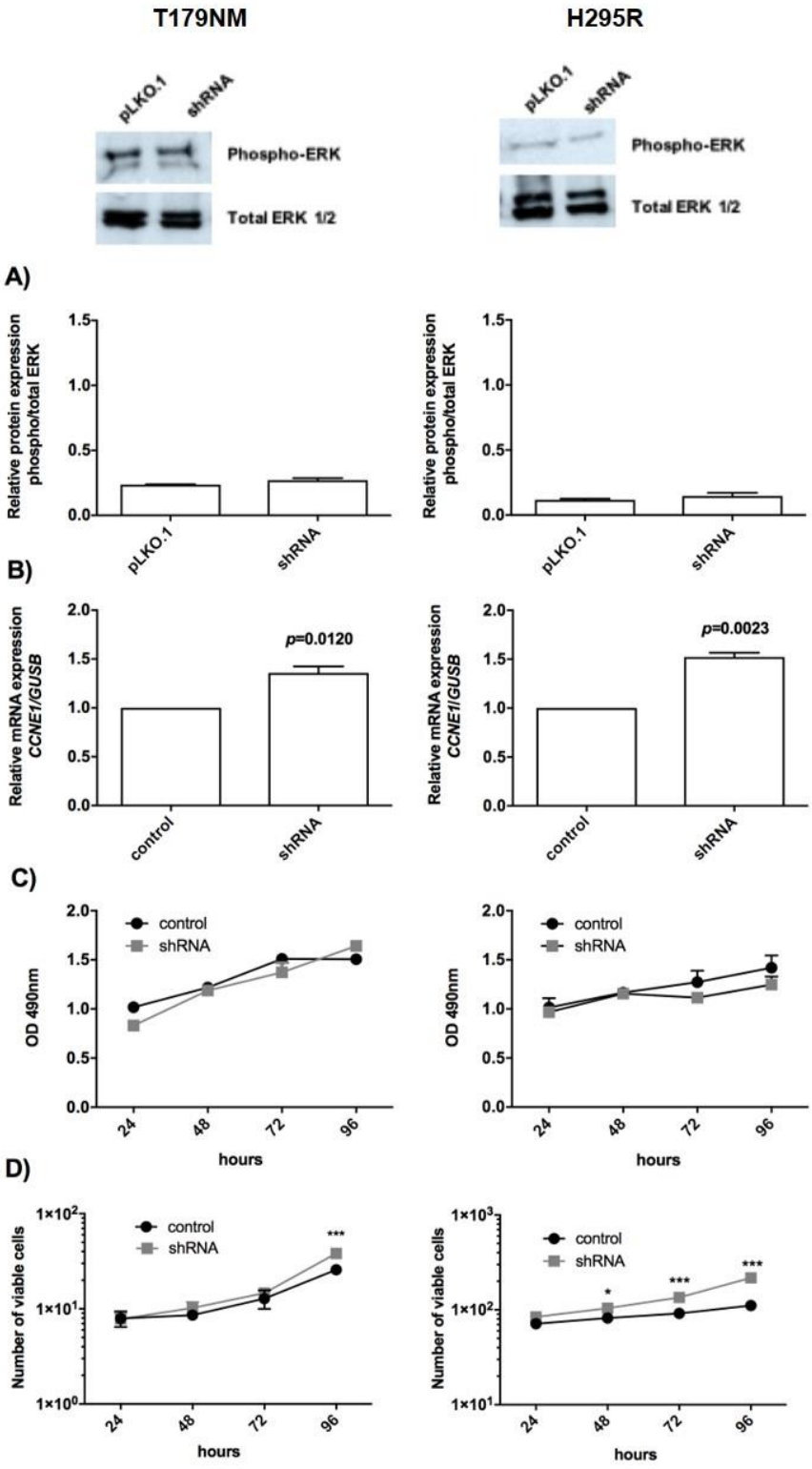

Figura 20 - Efeitos do silenciamento do *ARMC5* na fosforilação de ERK (A), na expressão do mRNA de *CCNE1* (B), na viabilidade (C) e no número de células viáveis (D) na linhagem H295R e na cultura de células de PMAH, T179NM.

- Análise da quantificação do DNA por citometria de fluxo e análise das imagens por *InCell Analyzer* em células de PMAH silenciadas ou não para o gene *ARMC5*

Como apresentado na Figura 21, cujo eixo X representa a intensidade/quantidade de DNA detectada pelo citômetro de fluxo, mostramos que as células de PMAH T179NM-silenciadas (shRNA) apresentaram uma quantidade maior de DNA do que as células controle, pLKO.1. O aumento da quantidade de DNA medida nas células de PMAH-silenciadas estão representadas nos gráficos nas cores vermelho, lilás e verde, e é maior do que nas células controle, representadas em preto.

A análise das imagens das células T179NM coradas com Hoescht (Figura 22) utilizando o equipamento *InCell Analyzer* mostraram que nas células silenciadas para o gene *ARMC5*, há uma quantidade maior de células em divisão, além da maior quantidade de DNA, o que sugere novamente que o *ARMC5* pode estar envolvido na proliferação celular.

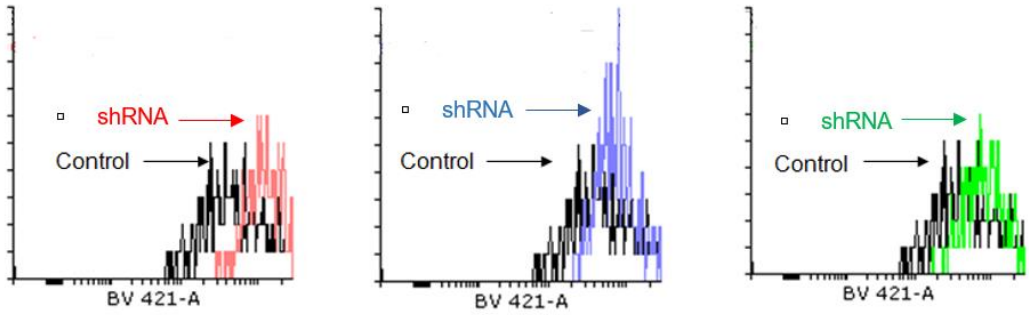

Figura 21 - Análise por citometria de fluxo da quantidade de DNA em células *ARMC5* silenciadas e controle em três experimentos diferentes.

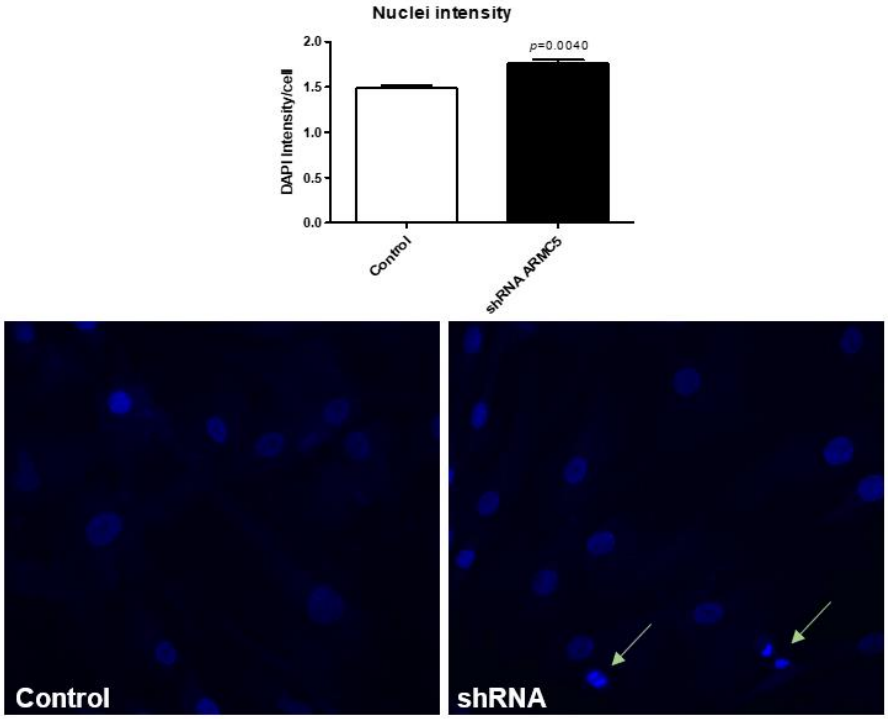

Figura 22 - Quantificação da intensidade do corante de DNA Hoescht em células de PMAH T179NM ARMC5-silenciadas e controle (acima), e fotomicrografia das células analisadas (abaixo). As setas amarelas mostram células silenciadas para ARMC5 em divisão.

4.9.2 Hiperexpressão do *ARMC5* na linhagem H295R e em culturas de células de PMAH carreadores, T112M e T177M, e não carreadora de mutações, T179NM

Após transfecção transiente com um vetor contendo o gene *ARMC5* e com o vetor vazio, na linhagem H295R e nas culturas de células T112M e T179NM de PMAH foi analisado o mRNA do *ARMC5* e de enzimas esteroidogênicas.

Observamos que tanto na linhagem H295R quanto nas células de PMAH, independentemente de serem carreadoras de mutações, a hiperexpressão do *ARMC5* levou ao aumento da expressão da *StAR*, do gene do receptor *MC2R*, bem como da síntese do cortisol nas células H295R. As demais enzimas estudadas apresentaram níveis de expressão similares ao controle. Nas Figuras 23, 24 e 25 é possível observarmos os efeitos da hiperexpressão do *ARMC5* na esteroidogênese das células H295R e nas culturas de PMAH T112M e T179NM, respectivamente.

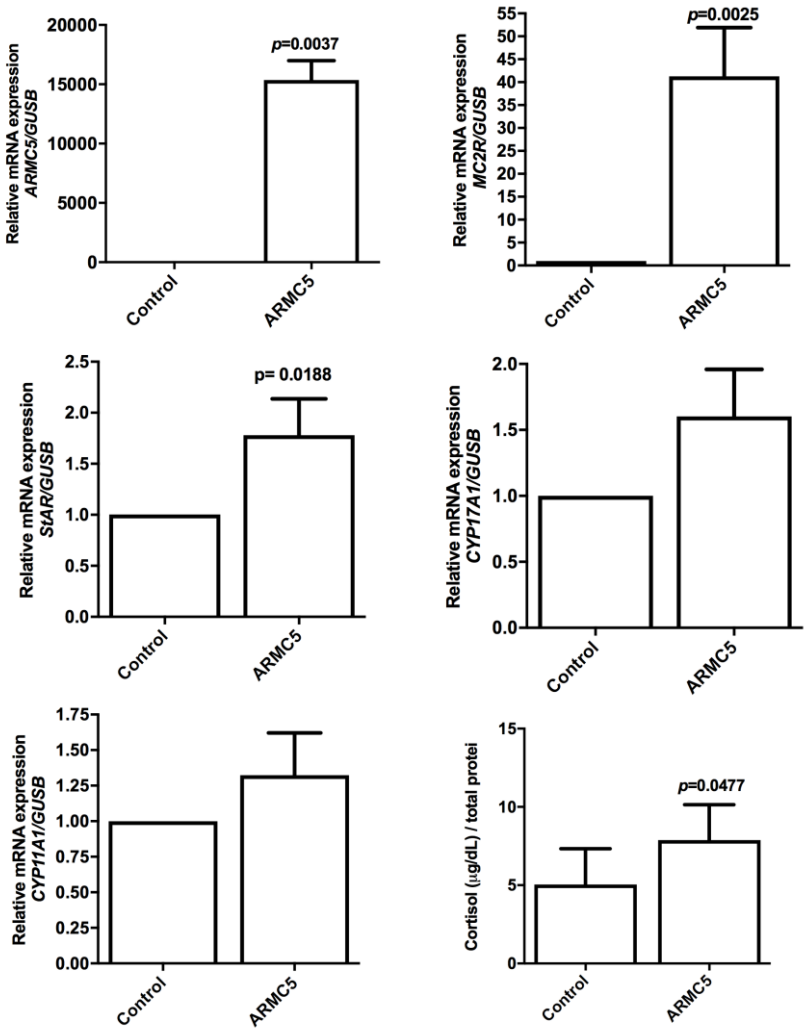

Figura 23 - Efeitos da hiperexpressão do *ARMC5* na expressão no mRNA dos genes *ARMC5, MC2R, StAR, CYP17A1* e *CYP11A1,* bem como na síntese do cortisol na linhagem H295R**.**

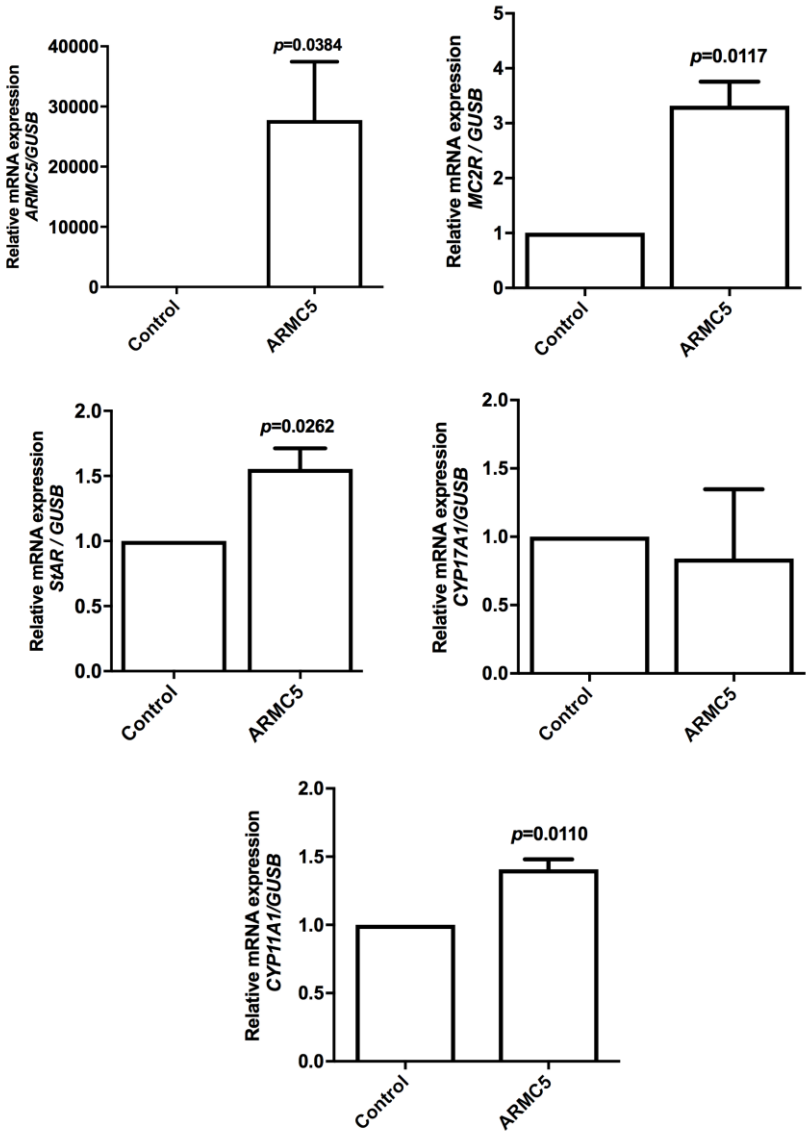

Figura 24 - Efeitos da hiperexpressão do *ARMC5* na expressão no mRNA dos genes *ARMC5, MC2R*, *StAR*, *CYP17A1* e *CYP11A1* na cultura de células de PMAH carreadora de mutação do gene *ARMC5,* T112**.**

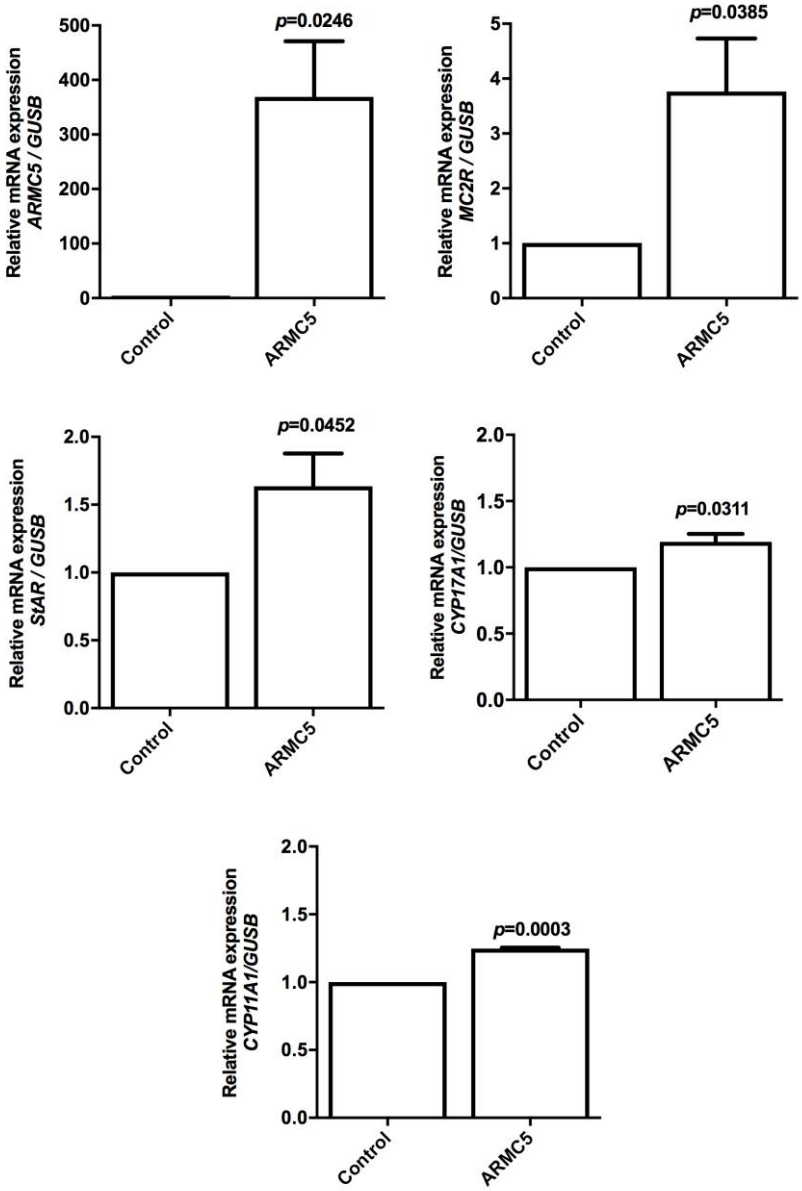

Figura 25 - Efeitos da hiperexpressão do *ARMC5* na expressão no mRNA dos genes *ARMC5, MC2R, StAR, CYP17A1* e *CYP11A1* na cultura de células de PMAH não carreadora de mutação do gene *ARMC5*, T179**.**

Em seguida, com o objetivo de analisar os efeitos do *ARMC5* na viabilidade celular, realizamos o monitoramento por 48h da cultura de PMAH T112M após a transfecção com um vetor contendo WT *ARMC5*, através de um ensaio com Anexina V e iodeto de propídeo associado ao *live cell imaging*. Desta forma, observamos que após 5h as células transfectadas com o vetor vazio e com o vetor

contendo o gene *ARMC5* mantinham a mesma viabilidade. No entanto, após 12h da transfecção, pudemos observar que as células contendo o *WT* ARMC5 apresentaram-se em apoptose (precoce e tardia) e necrose, em relação ao controle (Figura 26).

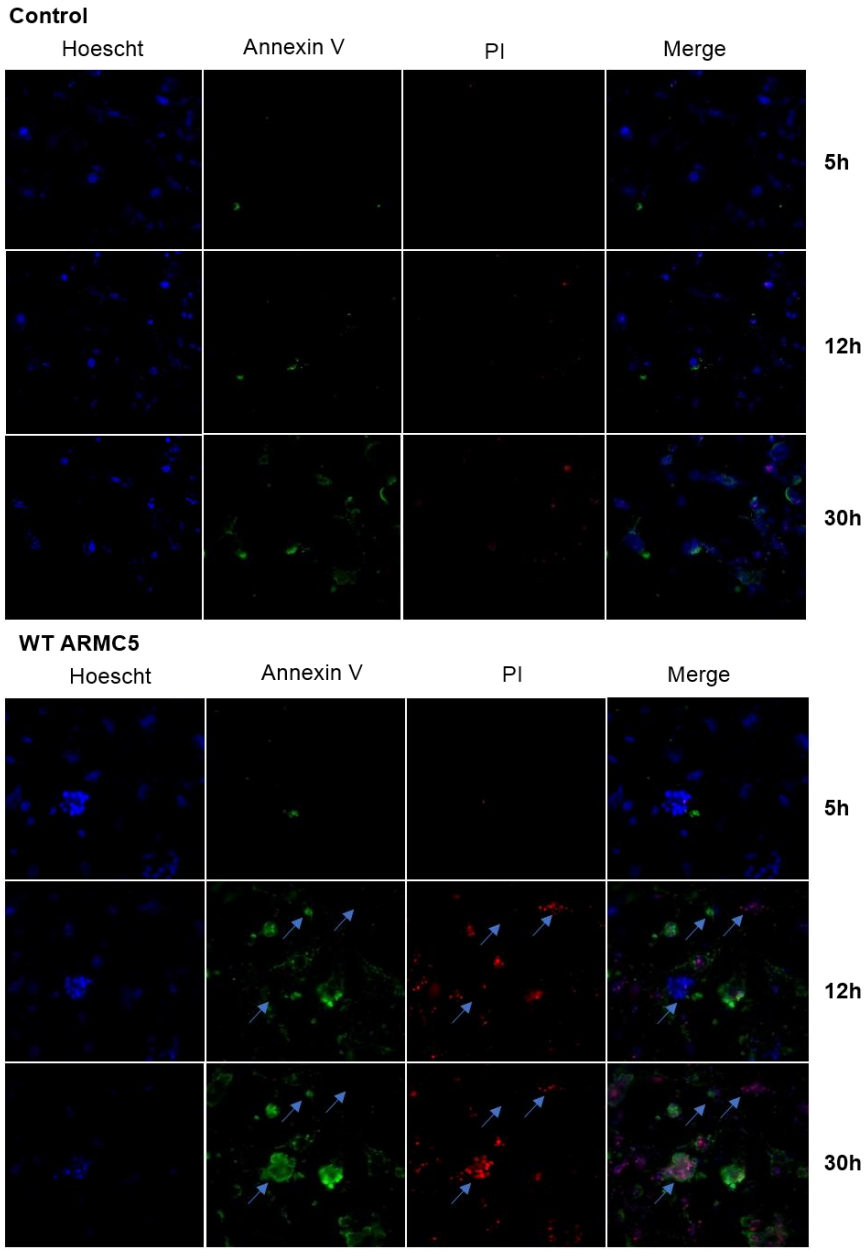

Figura 26 - Efeitos do *ARMC5* na viabilidade celular na cultura de células de PMAH, T112M, após 5, 12 e 30h de transfecção com o vetor controle e contendo WT *ARMC5*.

Além disto, utilizando contagens do número de células viáveis e do número de células em apoptose na linhagem H295R e nas culturas de PMAH, T177M, T112M e

T179NM, observamos que hiperexpressão do *ARMC5* levou à diminuição da viabilidade, através da morte por apoptose, nas células da linhagem H295R e nas culturas de PMAH após 24h, como apresentado na Figura 27.

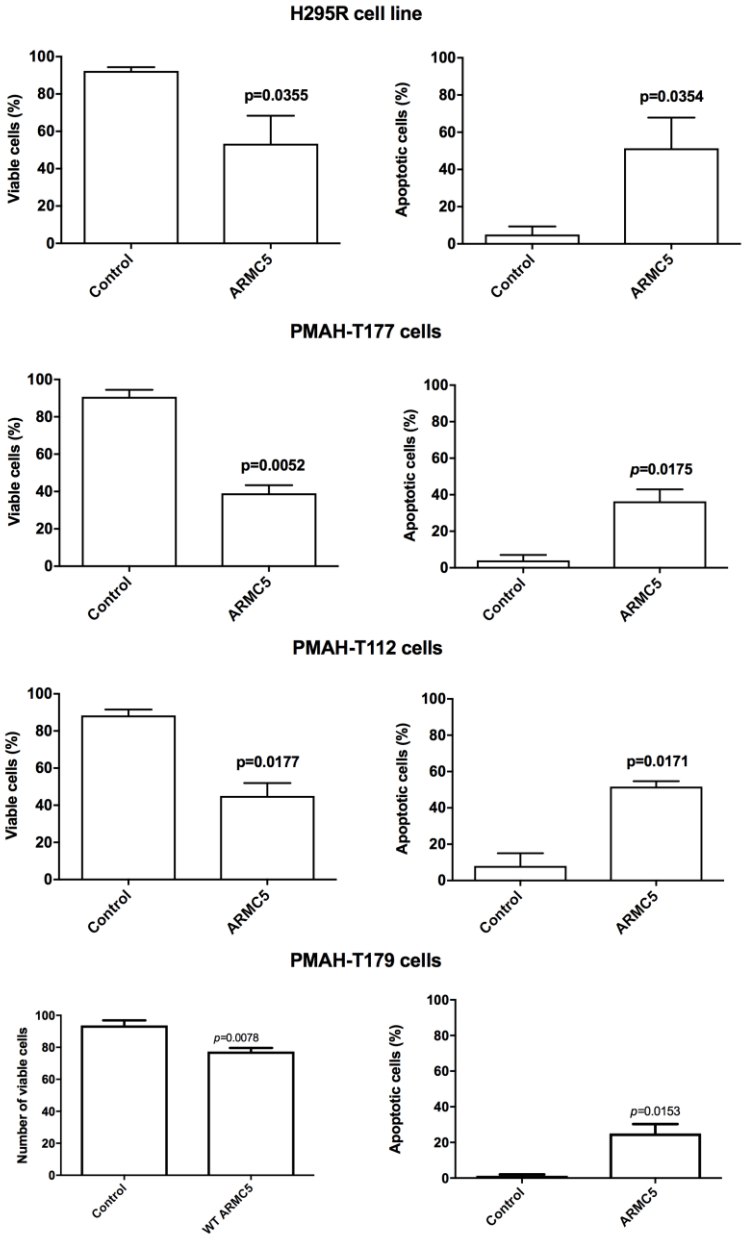

Figura 27 - Efeitos na viabilidade celular através da hiperexpressão do *ARMC5* na linhagem H295R e nas culturas de PMAH T177M, T112M e T179NM. Porcentagem de células viáveis (coluna esquerda) e de células em apoptose (coluna direita).

O conjunto destes resultados sugere que a proteína ARMC5 pode estar envolvida na esteroidogênese/produção de cortisol, na viabilidade celular e no controle da proliferação celular.

Análise por qPCR array de genes relacionados com a apoptose em células de PMAH após transfecção transiente com o gene *ARMC5*

A hiperexpressão do gene wild type (WT) *ARMC5* em diferentes tempos levou ao aumento da expressão de genes pro-apoptóticos (Figura 28). Observamos o aumento da expressão de genes como *NFKB1, TNF,* receptores e efetores de TNF, como *FADD, TRADD, FAS*, todos genes componentes da via extrínseca de apoptose celular. Após 48h, há uma expressão heterogênea de genes anti e pro-apoptóticos, e como nesta janela de tempo as células podem estar em processo de morte tardia, é mais difícil a interpretação dos resultados.

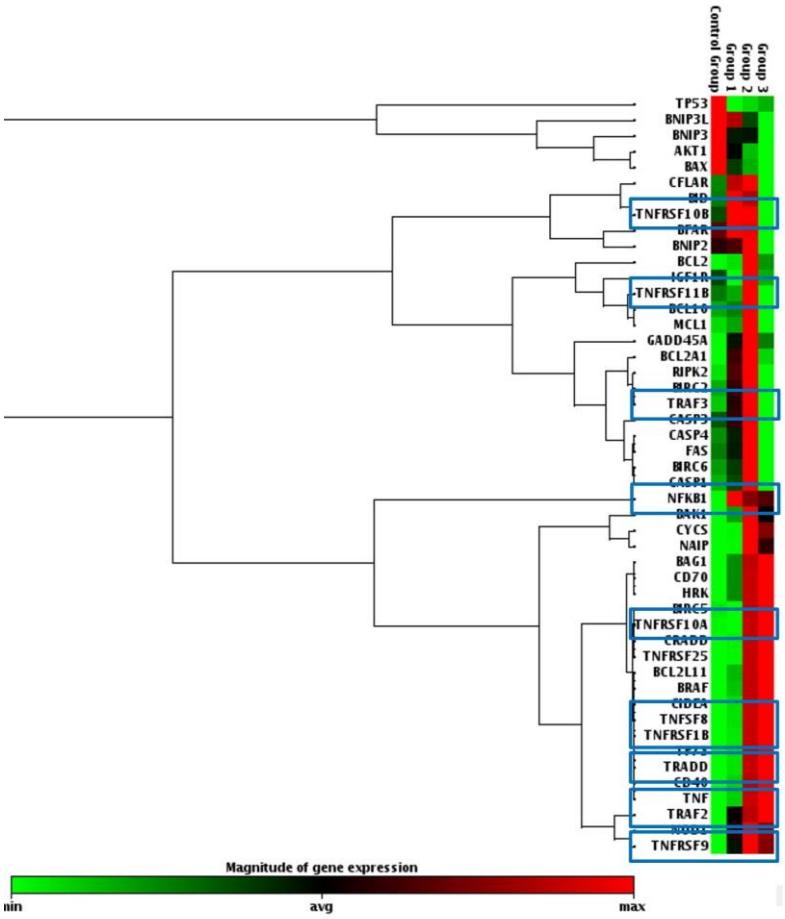

Figura 28 - Representação dos genes regulados após hiperexpressão do WT *ARMC5* em células de PMAH mutadas para este gene. Grupos 1, 2 e 3, se referem a 5, 24 e 48h após a transfecção. Os quadrados azuis são genes relacionados à morte celular induzida por TNF.

De forma geral, estes dados sugerem que o *ARMC5* pode causar a apoptose celular por meio da ativação da via extrínseca de apoptose, no entanto, ainda não sabemos se este mecanismo é direto ou indireto, isto é, se é desencadeado pela interação com outras proteínas.

Análise da proliferação celular e da viabilidade celular de células H295R cujo gene *ARMC5* foi ativado endogenamente pelo sistema CRISPR/dCas9

Visto que a hiperexpressão transiente com o vetor contendo *ARMC5* leva à apoptose celular, isto limita os possíveis estudos que possam ser realizados com este modelo. Desta forma, optamos por utilizar o sistema CRISPR dCas9, que

permite que o gene *ARMC5* seja ativado de forma endógena. Através da técnica CRISPR dCas9, ativamos de forma endógena a expressão do gene *ARMC5* em células da linhagem de carcinoma adrenocortical H295R (Figura 29). O dado apresentado refere-se ao sobrenadante viral com a sequência guia A3, pois foi a sequência testada que levou a um aumento significante da expressão do *ARMC5*.

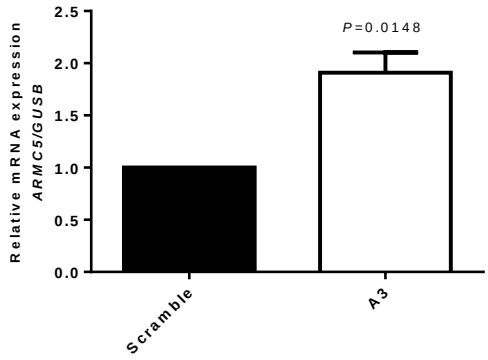

Figura 29 - Expressão relativa do gene *ARMC5* em células transduzidas com o controle (Scramble) e com a sequência guia A3 para o gene *ARMC5.*

Em seguida à ativação do gene, investigamos se o aumento na expressão do *ARMC5* levaria à alteração da proliferação e da viabilidade celular. Como pode ser observado nas Figura 30 e 31, não houve diferença na viabilidade e no potencial proliferativo de células controle, quando comparadas àquelas ativadas para *ARMC5*.

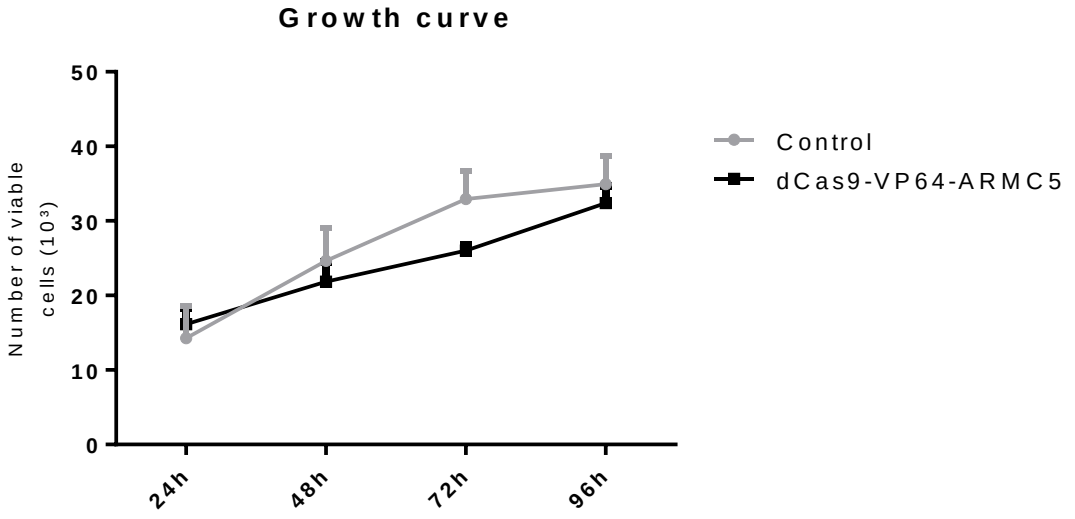

Figura 30 - Curva de crescimento de células transduzidas com o controle e com a sequência A3 para o gene *ARMC5.*

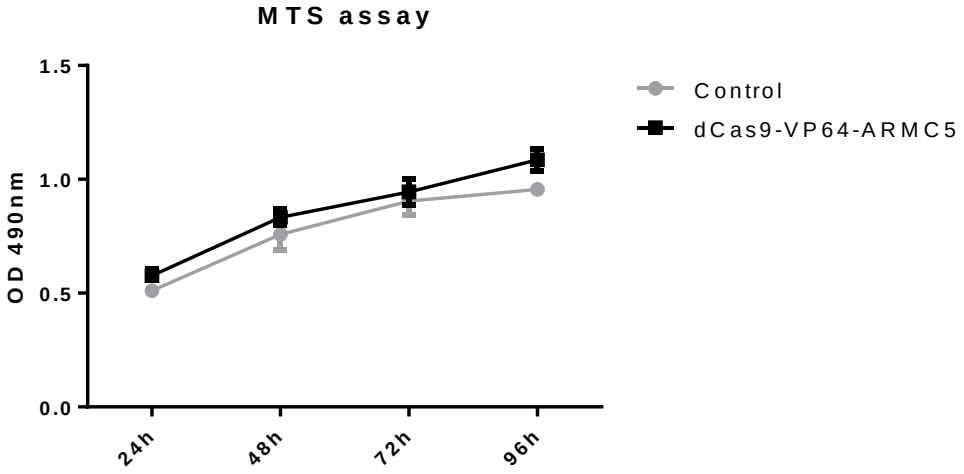

Figura 31 - Ensaio MTS de células transduzidas com o controle e com a sequência A3 para o gene *ARMC5.*

Como demonstrado, ainda que a expressão do gene *ARMC5* tenha aumentado após a ativação com o complexo CRISPR dCas9, esse aumento não foi suficiente para levar à uma alteração na viabilidade e proliferação destas células.

5. Discussão

Nesse estudo analisamos a morfologia, a função e a expressão de diferentes tipos moleculares que caracterizam as células que compõem os nódulos da hiperplasia macronodular primária, a PMAH. Com relação às características clínicas e moleculares dos pacientes dos quais essas células foram obtidas, oito dos nove pacientes (8/9) neste estudo, que apresentaram SC manifesta, são carreadores de mutações no gene *ARMC5,* enquanto que os quatro pacientes que apresentaram SC subclínica não são carreadores de mutações. Além disto, nos pacientes com mutações, as concentrações de ACTH plasmático estavam frequentemente abaixo do limite do ensaio e o cortisol sérico, mais alto. Adicionalmente, não houve diferença significante entre as concentrações de cortisol urinário, salivar, de cortisol sérico após administração de 1 mg de dexametasona, no peso ou tamanho das adrenais, entre os pacientes com ou sem mutações. É importante ressaltar que ainda não há um consenso na literatura sobre a associação entre as mutações no *ARMC5* e a gravidade da apresentação clínica da PMAH. Ainda com relação à presente casuística, assim como descrito na literatura (11), houve uma prevalência de acometimento em mulheres e em pacientes com idade maior que 50 anos de idade.

As mutações detectadas no sequenciamento direto foram analisadas *in silico* utilizando programas de predição como *Polyphen, Mutation Taster e Sift* e verificadas como possível causadoras de doença, o que leva a crer que sejam patogênicas. Apesar de não terem sido detectados sítios do tipo *hotspot* no gene *ARMC5,* a maioria das mutações foram identificadas nos exons 1, 2 e 3, umas das regiões responsáveis pelas interações proteína-proteína da família Armadillo, o que poderia afetar o recrutamento de proteínas parceiras da proteína ARMC5. O fato de

que as mutações somáticas encontradas nos nódulos e nas culturas são as mesmas é de suma importância, uma vez que diferentes mutações somáticas foram detectadas em diferentes nódulos provenientes de um mesmo paciente (46).

Morfologicamente as culturas de células de PMAH são homogêneas, isto é apresentam um mesmo padrão celular, diferentemente do que é observado na composição dos macronódulos da hiperplasia, que são compostos em maior número de células espongiformes ou células claras e em menor número, de células compactas (8, 9, 47). Interessantemente, essas células tendem a formar nódulos em cultura, o que não é observado nas culturas de células de adrenal normal ou na linhagem H295R. Quanto ao aspecto funcional, a presença de gotículas lipídicas no citoplasma das células de PMAH em cultura implica na presença de células esteroidogênicas potencialmente funcionais, como evidenciado em alguns experimentos. Além disso, as culturas de células de PMAH variam quanto à expressão do gene *ARMC5*, que pode ser mais reduzida em algumas culturas, o que foi também observado em um estudo realizado por Assié e cols (27). Nesse estudo a maioria dos pacientes com mutação no gene *ARMC5* apresentaram expressão reduzida da proteína, e de maneira mais evidente naqueles com mutações *missense* do gene *ARMC5,* que levam a um códon de parada prematuro. Ainda segundo esse trabalho, as mutações levam à inativação da proteína e perda da capacidade de induzir apoptose. De forma geral, as culturas de células estudadas que são portadoras da mutação apresentaram uma expressão variável e reduzida do gene *ARMC5*, o que poderia ser explicado pelo tipo de mutação presente em cada paciente. Resumindo, esses achados sugerem que as mutações no *ARMC5* podem afetar sua funcionalidade, no entanto, não necessariamente a sua expressão.

Levando em consideração o descrito por Sasano e cols em 1994 (10), que descreveram uma expressão preferencial das enzimas esteroidogênicas 3BHSD2 e CYP17A1, respectivamente, em células espongiformes e células compactas, analisamos a expressão dessas enzimas nas culturas de PMAH estudadas. A presença do RNAm de ambas enzimas sugere que os dois tipos celulares podem estar presentes nas culturas de células, demonstrando mais uma vez as culturas de células como modelos biológicos apropriados para os estudos moleculares e funcionais da PMAH.

A presença simultânea de receptores ectópicos e eutópicos aberrantemente expressos sugere potencialmente a heterogeneidade de respostas a diferentes ligantes, o que produz o mesmo efeito na esteroidogênese (43, 48). Além disto, demonstra que este mecanismo ocorre independentemente de mutações no gene *ARMC5,* embora até o momento não tenha sido descrita resposta ao GIP em pacientes com mutações (27). Como as células H295R também apresentaram expressão dos receptores ectópicos que foram analisados, essa ocorrência parece ser comum em neoplasias adrenocorticais (49).

Os mecanismos que levam à produção de ACTH ectópico em nódulos de PMAH ainda não foram esclarecidos, no entanto, há evidências de que isso ocorre devido a permanência de células denominadas *gonadal-like* provenientes do primórdio adrenogonadal, pela baixa expressão de T-pit, um fator de transdução que controla a diferenciação de corticotrofos hipofisários, e pela presença de marcadores gonadais, como *insulin-like* 3 (50, 51). .

Assim como o descrito em nódulos de PMAH por Louiset e cols (17), observamos níveis variáveis da expressão de *POMC* entre as culturas de células de PMAH, que são menores do que no *pool* comercial de adrenais normais. No

entanto, isso é esperado, visto que o *pool* de adrenal normal utilizado como comparação contém o córtex e a medula adrenal, e o ACTH está largamente expresso na medula adrenal como descrito por Louiset e cols (17). A presença do gene que codifica a enzima pro-hormônio convertase do tipo 1, *PCSK1,* sugere que estas células teriam capacidade de processar a POMC em peptídeos menores. Isto é reforçado pela presença do ACTH ectópico em *clusters* de células isolados nas culturas de PMAH, de forma similar àquela descrita em tecido de macronódulos hiperplásicos (16, 17).

Assim como algumas das características descritas acima, a presença de *POMC* e ACTH ectópico ocorrem independentemente de mutações do gene *ARMC5.* Com relação ao receptor de ACTH, de forma geral, as células de PMAH apresentaram expressão do *MC2R* menor e varável em relação ao *pool* de adrenais humanas normais, como já havia sido descrito previamente (17). No entanto, como trata-se de culturas representativas de pacientes e estágios diferentes da doença, é esperado que ocorra esta variação na expressão do receptor. Além disso, especulamos que, caso o ACTH tenha capacidade de ser secretado pelas células, ele poderia ter ação tanto autócrina quanto parácrina, sustentando a síntese de cortisol relacionada à PMAH.

No córtex adrenal normal, o ACTH tem um papel bem estabelecido estimulando proliferação e esteroidogênese, principalmente na forma de cortisol (4). O cortisol produzido age no hipotálamo e na hipófise, inibindo a liberação de CRH e a produção de ACTH através de um mecanismo de *feedback* negativo (1). Em conjunto, os resultados analisados após estímulo com ACTH e FK mostraram aumento da expressão de enzimas esteroidogênicas, da síntese de cortisol e regulação positiva seu receptor MC2R, como já descrito anteriormente (52). No

entanto, esses resultados contrastam com o descrito por Mazzuco e cols (43), que não observaram aumento da produção de cortisol após estímulo com ACTH em culturas primárias de PMAH, e sim após estímulo com agonistas dos receptores de vasopressina e serotonina. Ainda que tenhamos como hipótese que somente uma subpopulação de células estimuladas através de receptores ectópicos seja capaz de induzir a produção de *POMC* e ACTH ectópico nos clusters de células de PMAH, observamos que o aumento da expressão do mRNA da *POMC* ocorreu com FK e ACTH nas células T190NM.

O aumento de *POMC* e ACTH intraadrenal foi observado em células da linhagem H295R quando transfectadas com um vetor contendo receptor ectópico GIPR e tratadas com seu ligante (53). Além disto, o aumento de ACTH plasmático foi observado através do cateterismo das veias adrenais após tratamento com serotonina (17), o que reforça a hipótese de que a via ativada pelos receptores ectópicos pode levar à produção de ACTH intrácrino. No entanto, como observamos que o ACTH provoca o mesmo efeito nas células de PMAH T190NM e T191M, especulamos que este mecanismo pode não ser desencadeado exclusivamente por estímulos iniciados em receptores aberrantes. Ainda assim, vale ressaltar que os modelos utilizados para o presente estudo, culturas secundárias das hiperplasias e a linhagem de carcinoma adrenocortical, H295R, são sistemas biológicos diferentes, podendo resultar em diferentes respostas.

A habilidade do ACTH estimular seu próprio precursor em cultura de células de PMAH reforça a possibilidade de um mecanismo autócrino desencadeado pelo ACTH ectópico secretado pelos nódulos adrenais, fenômeno que permitiria à PMAH ser independente do ACTH hipofisário. Sabe-se que a PKA estimula a atividade transcricional do promotor do *POMC* através da regulação de canais de cálcio em

corticotrofos (54, 55). Além disto, já foi considerado que a ativação de cAMP/PKA estimularia a expressão de *POMC* também em células hiperplásicas (50), o que corrobora com o efeito desencadeado pelo ACTH no gene *POMC* no presente estudo. Para testar esta hipótese, tratamos células de PMAH com um inibidor específico da via PKA, H89, e observamos que através da inibição dessa via, o aumento da expressão do gene *Pomc* pelo ACTH é inibido, mostrando a importância da via PKA nesse mecanismo, e que explicaria, pelo menos parcialmente, a independência da produção do cortisol na PMAH.

Por outro lado, o estímulo com vasopressina não modulou a esteroidogênese e a transcrição do gene *POMC* em células de PMAH, apesar da presença do RNAm de receptores de AVP. Similarmente, Louiset e cols (48) não observaram resposta após uma cultura primária de células de PMAH ter sido estimulada com serotonina, apesar da presença dos receptores 5HT4. Para melhor entendimento desses fenômenos, tanto a expressão da proteína desses receptores quanto sua localização na célula precisam ser estudados.

O papel do *ARMC5* e sua importância na PMAH não foram totalmente elucidados. Neste estudo, observamos que o silenciamento do *ARMC5* em uma cultura de PMAH não mutada e em células da linhagem H295R levou à diminuição do mRNA de enzimas esteroidogênicas em etapas diferentes da esteroidogênese, como a transcrição do gene *NR5A1* e do gene *MC2R.* Observamos também que as células da linhagem H295R silenciadas para ARMC5 apresentaram diminuição da síntese de cortisol, como previamente descrito por Assié e cols (27). O contraste entre o silenciamento do *ARMC5* levar à diminuição da esteroidogênese e o hipercortisolismo detectado na PMAH pode ser explicado pelo consequente aumento do número de células supostamente causada pelas mutações no *ARMC5,*

ou mesmo por uma possível ativação de receptores aberrantes ou pelo ACTH ectópico, o que causaria independência do eixo HPA, e consequente produção de cortisol. Estes dados reforçam a importância do *ARMC5* na esteroidogênese relacionada à PMAH, ainda que não se saiba por quais mecanismos o *ARMC5* exerce sua função ou funções.

A PMAH é uma doença adrenocortical heterogênea absolutamente benigna que apresenta baixos índices mitóticos e de evolução insidiosa, cujos pacientes normalmente são diagnosticados após a quinta década de vida (9, 11). Este contexto poderia explicar o fato de não observarmos uma ativação da via MAPK/ERK, frequentemente relacionada a estímulos mitogênicos, nas células de PMAH silenciadas para *ARMC5*. No entanto, o aumento na expressão do RNAm de *CCNE1* nessas células indicam que esta proteína pode estar envolvida no controle do ciclo celular, uma vez que a Ciclina E1 é importante para a transição G1/S do ciclo celular (56). Recentemente, foi observado que a proteína ARMC5 não apresenta atividade enzimática e que sua função depende da interação com proteínas (38), isto é, da formação de homo ou heterodímeros envolvidos com diversas vias, incluindo àquelas relacionadas à apoptose e ao controle do ciclo celular.

O aumento no número de células nas células cujo gene *ARMC5* foi silenciado sugere seu envolvimento no controle da proliferação celular. No entanto, devido ao não envolvimento da via ERK, a diminuição da expressão de *ARMC5* em células transduzidas com shRNA pode estar relacionada à perda do controle da capacidade de entrar em apoptose, e não por um aumento da capacidade proliferativa exclusivamente. Considerando que o *ARMC5* é potencialmente um gene supressor de tumor como sugerido por Assié e colaboradores (19), sua ação poderia ocorrer

de duas formas após ser silenciado: 1) por aumento da proliferação ou 2) por inibição da apoptose, o que de ambas as formas levaria ao aumento do número de células viáveis. No entanto, visto que o aumento do número de células e da quantidade de DNA com o silenciamento do *ARMC5* é discreto, é difícil responsabilizar somente a perda de funcionalidade do *ARMC5*, que ocorre através de mutações inativadoras desse gene, à formação de nódulos e hiperplasia adrenal. Além disto, dois estudos recentes, com modelos de camundongos *knockout* para ARMC5, apresentaram animais com aumento significante das adrenais em animais idosos, no entanto, sem formação de macronódulos (57). Como apontado por Hu e cols (2017) (38), a proteína ARMC5 pode desempenhar funções opostas, dependendo do contexto e tipo celular, e das condições do microambiente. Portanto, estudos futuros para elucidação das funções do *ARMC5* deverão levar em conta essas questões.

Neste estudo analisamos também a resposta de culturas celulares portadoras ou não de diferentes mutações no gene *ARMC5* frente à hiperexpressão deste gene em sua forma selvagem (WT) utilizando a técnica de transfecção transiente. Observamos que a hiperexpressão do *ARMC5* iniciou a promoção de morte celular através de apoptose e necrose após 12 horas nas as culturas de PMAH investigadas. Com estes resultados reforçamos a importância da *ARMC5* como uma proteína que favorece a apoptose celular, como havia sido descrito por Assié e cols. e Espiard e cols. (22, 27) em células H295R. Interessantemente, a diminuição da viabilidade celular é mais evidente em culturas de células de PMAH carreadoras de diferentes mutações no gene *ARMC5* do que em culturas selvagens, e isto poderia ser explicado pela restauração do fenótipo de uma proteína que não é ou é

parcialmente funcional nestas células. No entanto, os mecanismos pelos quais o *WT ARMC5* diminui a viabilidade celular ainda são desconhecidos.

A heterogeneidade clínica apresentada pelos pacientes diagnosticados com PMAH poderia também ser explicada pelas interações da proteína ARMC5 com diferentes proteínas, ou mesmo pela localização das mutações no gene. Especulamos que pacientes com uma apresentação clínica mais grave sejam portadores de mutação em sítios de recrutamento de proteínas, o que impediria a ação da proteína ARMC5. Temos como hipótese que a perda de função do *ARMC5* seria suficiente para acarretar a diminuição da capacidade esteroidogênica e a perda do controle do ciclo celular e com isto, o equilíbrio entre a proliferação e a morte celular. O aumento do cortisol ocorreria, apesar da diminuição da capacidade esteroidogênica, pelo aumento do número de células observada pela formação dos macronódulos.

Em conclusão, pela primeira vez foram estudados os aspectos morfológicos, moleculares e funcionais das células provenientes de nódulos de hiperplasia de pacientes diagnosticados com PMAH, que mantidas em culturas secundárias, representam a heterogeneidade característica desta doença. Este estudo confirmou o envolvimento do *ARMC5* na esteroidogênese relacionada à PMAH e o papel do *ARMC5* no processo de apoptose celular. Além disto, mostramos outras possíveis funções relacionadas ao papel do gene *ARMC5*, como o controle do ciclo celular e proliferação, que poderiam explicar a origem dos macronódulos característicos da PMAH, como proposto na Figura 32. O conjunto de resultados apresentados, e em vista de que a proteína ARMC5 pode interagir com diferentes proteínas modulando diversas vias, reforçam que a PMAH pode se apresentar como uma síndrome, envolvendo assim a alteração de mais de um órgão e sistemas. Estudos futuros são

necessários para entender como os mecanismos descritos no presente trabalho darão origem ao fenótipo desta complexa doença do córtex adrenal.

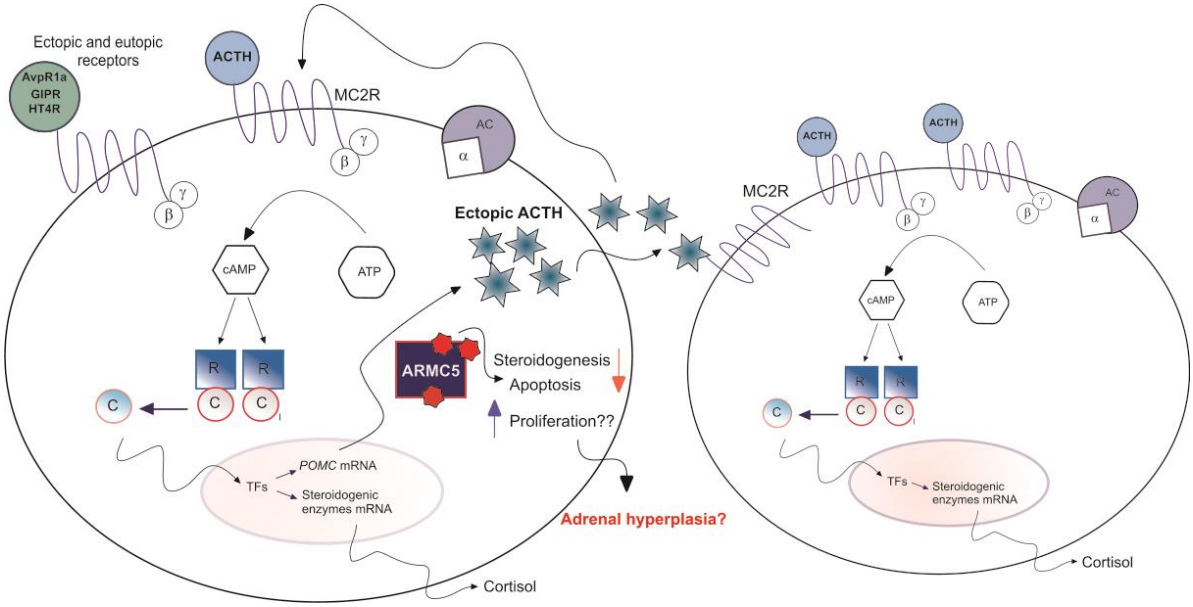

Figura 32 – Resumo dos achados neste estudo sobre a regulação do córtex adrenal de células provenientes de nódulos de PMAH: o ACTH ectópico age de forma parácrina e autocria através do MC2R para ativar a via PKA, estimulando a produção de cortisol e a transcrição do gene *POMC,* que em seguida, dará origem ao ACTH em clusters de células nos nódulos de PMAH, conferindo a esta doença independência do eixo HPA e autonomia na esteroidogênese. Concomitantemente, mutações no gene *ARMC5* levariam à hiperplasia adrenal através da regulação da esteroidogênese, da apoptose celular e proliferação através de mecanismos ainda desconhecidos. Fonte: Lotfi e cols, 2018 **(58).**

6. Conclusões

1- As culturas de células de PMAH utilizadas neste estudo representam os nódulos de PMAH presentes nos pacientes, e se mostraram modelos biológicos adequados para este estudo.

2- Foi descrita pela primeira vez a indução pelo ACTH da expressão de seu precursor, o gene *POMC,* em células de PMAH, e que o mecanismo pelo qual isso ocorre é regulado pela via PKA.

3- O estudo funcional do gene *ARMC5* nas células H295R e em células obtidas de nódulos de pacientes diagnosticados com PMAH reforça a importância do *ARMC5* na regulação da esteroidogênese e no controle da morte celular. Além

disto, nossos resultados sugerem que o *ARMC5* pode estar relacionado ao controle do ciclo celular e da proliferação celular.

7. Referências

1. Keller-Wood ME, Dallman MF. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. Endocr Rev. 1984;5(1):1-24.
2. Cushing H. The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism). 1932. Obes Res. 1994;2(5):486-508.
3. Arnaldi G, Angeli A, Atkinson AB, Bertagna X, Cavagnini F, Chrousos GP, et al. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(12):5593-602.
4. de Joussineau C, Sahut-Barnola I, Levy I, Saloustros E, Val P, Stratakis CA, et al. The cAMP pathway and the control of adrenocortical development and growth. Mol Cell Endocrinol. 2012;351(1):28-36.
5. Newell-Price J. Cushing's syndrome. Clin Med. 2008;8(2):204-8.
6. Lacroix A. ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2009;23(2):245-59.
7. Kirschner Ma, Powell Rd, 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.
8. Alencar GA, Lerario AM, Nishi MY, Mariani BM, Almeida MQ, Tremblay J, et al. ARMC5 Mutations are a Frequent Cause of Primary Macronodular Adrenal Hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab. 2014:jc20134237.
9. Antonini SR, Fragoso MC, Lacroix A. [Clinical and molecular aspects of the ACTH-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia]. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2004;48(5):620-36.
10. Sasano H, Suzuki T, Nagura H. ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia: immunohistochemical and in situ hybridization studies of steroidogenic enzymes. Mod Pathol. 1994;7(2):215-9.
11. Lacroix A, Feelders RA, Stratakis CA, Nieman LK. Cushing's syndrome. Lancet. 2015;386(9996):913-27.
12. Cavalcante IP, Zerbini MC, Alencar GA, Mariani BP, Buchpiguel CA, Almeida MQ, et al. High 18F-FDG uptake in PMAH correlated with normal expression of Glut1, HK1, HK2, and HK3. Acta Radiol. 2015.
13. Metser U, Miller E, Lerman H, Lievshitz G, Avital S, Even-Sapir E. 18F-FDG PET/CT in the evaluation of adrenal masses. J Nucl Med. 2006;47(1):32-7.

14. Lacroix A, Ndiaye N, Tremblay J, Hamet P. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. Endocr Rev. 2001;22(1):75-110.
15. Bourdeau I, Stratakis CA. Cyclic AMP-dependent signaling aberrations in macronodular adrenal disease. Ann N Y Acad Sci. 2002;968:240-55.
16. MAA P, RS A, H B. Síndrome de Cushing associada à hiper plasia macronodular das adrenais. Apresentação de um caso e revisão da literatura. Arq Bras Endocrinol Metabol2001. p. 27.
17. Louiset E, Duparc C, Young J, Renouf S, Tetsi Nomigni M, Boutelet I, et al. Intraadrenal corticotropin in bilateral macronodular adrenal hyperplasia. N Engl J Med. 2013;369(22):2115-25.
18. Candida Barisson Villares Fragoso M, Pontes Cavalcante I, Meneses Ferreira A, Marinho de Paula Mariani B, Ferini Pacicco Lotfi C. Genetics of primary macronodular adrenal hyperplasia. Presse Med. 2018;47(7-8 Pt 2):e139-e49.
19. Assie G, Libe R, Espiard S, Rizk-Rabin M, Guimier A, Luscap W, et al. ARMC5 Mutations in Macronodular Adrenal Hyperplasia with Cushing's Syndrome. N Engl J Med. 2013;369(22):2105-14.
20. Faucz FR, Zilbermint M, Lodish MB, Szarek E, Trivellin G, Sinaii N, et al. Macronodular adrenal hyperplasia due to mutations in an armadillo repeat containing 5 (ARMC5) gene: a clinical and genetic investigation. J Clin Endocrinol Metab. 2014;99(6):E1113-9.
21. Bourdeau I, Oble S, Magne F, Lévesque I, Cáceres-Gorriti KY, Nolet S, et al. ARMC5 mutations in a large French-Canadian family with cortisol-secreting β-adrenergic/vasopressin responsive bilateral macronodular adrenal hyperplasia. Eur J Endocrinol. 2016;174(1):85-96.
22. Espiard S, Drougat L, Libé R, Assié G, Perlemoine K, Guignat L, et al. ARMC5 Mutations in a Large Cohort of Primary Macronodular Adrenal Hyperplasia: Clinical and Functional Consequences. J Clin Endocrinol Metab. 2015;100(6):E926-35.
23. Gagliardi L, Schreiber AW, Hahn CN, Feng J, Cranston T, Boon H, et al. ARMC5 Mutations Are Common in Familial Bilateral Macronodular Adrenal Hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab. 2014;99(9):E1784-92.
24. Suzuki S, Tatsuno I, Oohara E, Nakayama A, Komai E, Shiga A, et al. GERMLINE DELETION OF ARMC5 IN FAMILIAL PRIMARY MACRONODULAR ADRENAL HYPERPLASIA. Endocr Pract. 2015;21(10):1152-60.
25. Yu L, Zhang J, Guo X, Chen X, He Z, He Q. ARMC5 mutations in familial and sporadic primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia. PLoS One. 2018;13(1):e0191602.

26. Rego T, Fonseca F, Espiard S, Perlemoine K, Bertherat J, Agapito A. mutation in a Portuguese family with primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia (PBMAH). Endocrinol Diabetes Metab Case Rep. 2017;2017.
27. Assié G, Libé R, Espiard S, Rizk-Rabin M, Guimier A, Luscap W, et al. ARMC5 mutations in macronodular adrenal hyperplasia with Cushing's syndrome. N Engl J Med. 2013;369(22):2105-14.
28. Fragoso MC, Alencar GA, Lerario AM, Bourdeau I, Almeida MQ, Mendonca BB, et al. Genetics of primary macronodular adrenal hyperplasia. J Endocrinol. 2015;224(1):R31-43.
29. Peifer M, Berg S, Reynolds AB. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. Cell. 1994;76(5):789-91.
30. Coates JC. Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom. Trends Cell Biol. 2003;13(9):463-71.
31. Tewari R, Bailes E, Bunting KA, Coates JC. Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures. Trends Cell Biol. 2010;20(8):470-81.
32. Xu W, Kimelman D. Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. J Cell Sci. 2007;120(Pt 19):3337-44.
33. Drougat L, Espiard S, Bertherat J. Genetics of primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia: a model for early diagnosis of Cushing's syndrome? Eur J Endocrinol. 2015;173(4):M121-31.
34. Drougat L, Omeiri H, Lefèvre L, Ragazzon B. Novel Insights into the Genetics and Pathophysiology of Adrenocortical Tumors. Front Endocrinol (Lausanne). 2015;6:96.
35. Berthon A, Faucz F, Bertherat J, Stratakis CA. Analysis of ARMC5 expression in human tissues. Mol Cell Endocrinol. 2017;441:140-5.
36. Fragoso MC, Domenice S, Latronico AC, Martin RM, Pereira MA, Zerbini MC, et al. Cushing's syndrome secondary to adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia due to activating mutations of GNAS1 gene. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(5):2147-51.
37. Elbelt U, Trovato A, Kloth M, Gentz E, Finke R, Spranger J, et al. Molecular and Clinical Evidence for an ARMC5 Tumor Syndrome: Concurrent Inactivating Germline and Somatic Mutations are Associated with both Primary Macronodular Adrenal Hyperplasia and Meningioma. J Clin Endocrinol Metab. 2014:jc20142648.
38. Hu Y, Lao L, Mao J, Jin W, Luo H, Charpentier T, et al. Armc5 deletion causes developmental defects and compromises T-cell immune responses. Nat Commun. 2017;8:13834.

39. Srougi V, Rocha BA, Tanno FY, Almeida MQ, Baroni RH, Mendonça BB, et al. The Use of Three-dimensional Printers for Partial Adrenalectomy: Estimating the Resection Limits. Urology. 2016;90:217-20.
40. Rainey WE, Bird IM, Mason JI. The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies. Mol Cell Endocrinol. 1994;100(1-2):45-50.
41. Koopman R, Schaart G, Hesselink MK. Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. Histochem Cell Biol. 2001;116(1):63-8.
42. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402-8.
43. Mazzuco TL, Thomas M, Martinie M, Cherradi N, Sturm N, Feige JJ, et al. Cellular and molecular abnormalities of a macronodular adrenal hyperplasia causing beta-blocker-sensitive Cushing's syndrome. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2007;51(9):1452-62.
44. Hofland J, Hofland LJ, van Koetsveld PM, Steenbergen J, de Herder WW, van Eijck CH, et al. ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia reveals prevalent aberrant in vivo and in vitro responses to hormonal stimuli and coupling of arginine-vasopressin type 1a receptor to 11β-hydroxylase. Orphanet J Rare Dis. 2013;8:142.
45. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. Nat Methods. 2014;11(8):783-4.
46. Correa R, Zilbermint M, Berthon A, Espiard S, Batsis M, Papadakis GZ, et al. The ARMC5 gene shows extensive genetic variance in primary macronodular adrenocortical hyperplasia. Eur J Endocrinol. 2015;173(4):435-40.
47. Sasano H. Localization of steroidogenic enzymes in adrenal cortex and its disorders. Endocr J. 1994;41(5):471-82.
48. Louiset E, Contesse V, Groussin L, Cartier D, Duparc C, Barrande G, et al. Expression of serotonin7 receptor and coupling of ectopic receptors to protein kinase A and ionic currents in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(11):4578-86.
49. Lacroix A, Baldacchino V, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J. Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. Trends Endocrinol Metab. 2004;15(8):375-82.
50. Lefebvre H, Duparc C, Prévost G, Bertherat J, Louiset E. Cell-to-cell communication in bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing hypercortisolism. Front Endocrinol (Lausanne). 2015;6:34.

51. Lefebvre H, Thomas M, Duparc C, Bertherat J, Louiset E. Role of ACTH in the Interactive/Paracrine Regulation of Adrenal Steroid Secretion in Physiological and Pathophysiological Conditions. Front Endocrinol (Lausanne). 2016;7:98.
52. Mountjoy KG, Bird IM, Rainey WE, Cone RD. ACTH induces up-regulation of ACTH receptor mRNA in mouse and human adrenocortical cell lines. Mol Cell Endocrinol. 1994;99(1):R17-20.
53. Fujii H, Tamamori-Adachi M, Uchida K, Susa T, Nakakura T, Hagiwara H, et al. Marked cortisol production by intracrine ACTH in GIP-treated cultured adrenal cells in which the GIP receptor was exogenously introduced. PLoS One. 2014;9(10):e110543.
54. Kovalovsky D, Refojo D, Liberman AC, Hochbaum D, Pereda MP, Coso OA, et al. Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. Mol Endocrinol. 2002;16(7):1638-51.
55. Boutillier AL, Gaiddon C, Lorang D, Roberts JL, Loeffler JP. Transcriptional activation of the proopiomelanocortin gene by cyclic AMP-responsive element binding protein. Pituitary. 1998;1(1):33-43.
56. Möröy T, Geisen C. Cyclin E. Int J Biochem Cell Biol. 2004;36(8):1424-39.
57. Berthon A, Faucz FR, Espiard S, Drougat L, Bertherat J, Stratakis CA. Age-dependent effects of Armc5 haploinsufficiency on adrenocortical function. Hum Mol Genet. 2017;26(18):3495-507.
58. Lotfi CFP, Kremer JL, Dos Santos Passaia B, Cavalcante IP. The human adrenal cortex: growth control and disorders. Clinics (Sao Paulo). 2018;73(suppl 1):e473s.