

**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<sup>1</sup>

**Co-orientadora:** Prof. Dra. Claudimara FP Lotfi<sup>2</sup>

**Instituições:**

<sup>1</sup> 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)

<sup>2</sup> Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

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.  
p.

Tese (Doutorado) -- 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.

## 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. 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. *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-

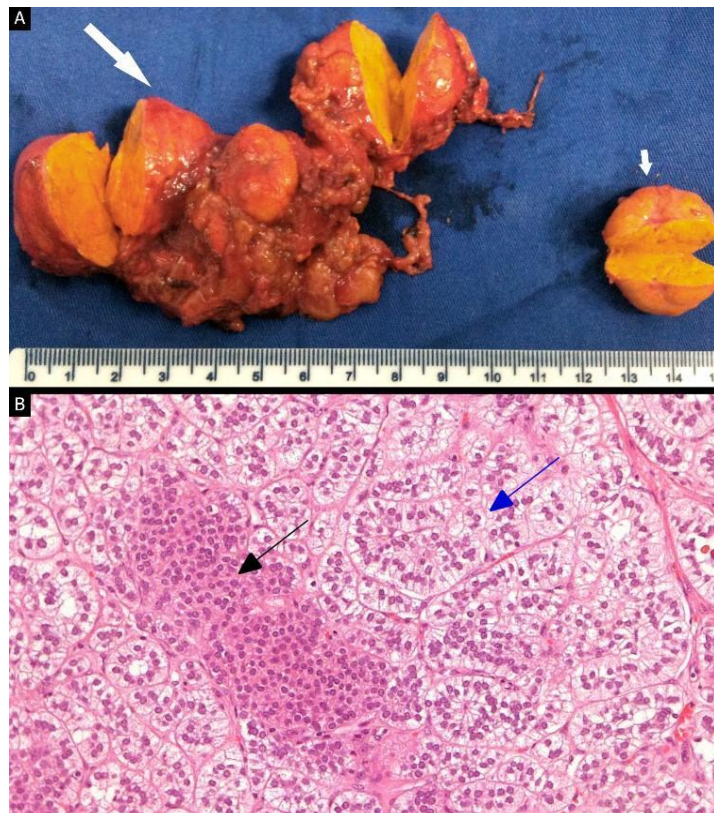
95%) (5). As lesões bilaterais são menos comuns e incluem a hiperplasia micronodular pigmentosa primária (PPNAD) e a hiperplasia adrenal macronodular primária (PMAH).

#### **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<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> 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 subdiagnosticada (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 imunistoquímica mostraram uma expressão distinta de algumas das enzimas esteroidogênicas nos tipos celulares encontrados nos nódulos estudados (10). Desta forma, foi observado que a enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase do tipo 2 (3 $\beta$ -HSD2) encontra-se expressa exclusivamente nas células grandes, de citoplasma claro, enquanto que a enzima 17 $\alpha$ -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 ( $^{18}\text{F}$ -FDG), acoplada à tomografia computadorizada ( $^{18}\text{F}$ -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).

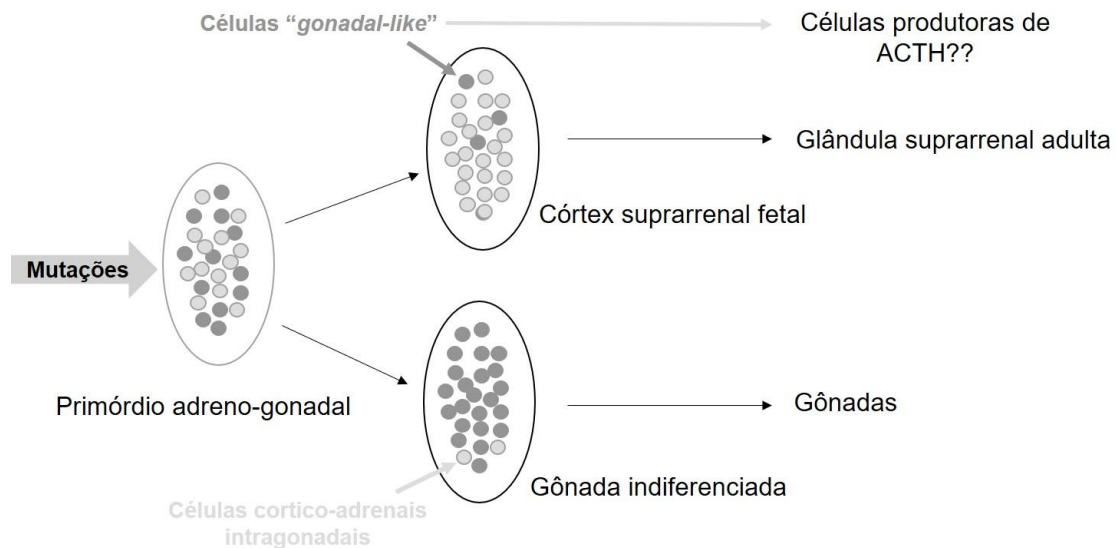
### **1.6 Mecanismos Moleculares Envolvidos na PMAH**

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 intríntrico 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 familiar como na forma aparentemente esporádica da doença (8, 19-24). Mais especificamente, mutações germinativas em heterozigose no *ARMC5* foram identificadas em 38-55% dos pacientes com a doença em coortes diferentes (8, 19).

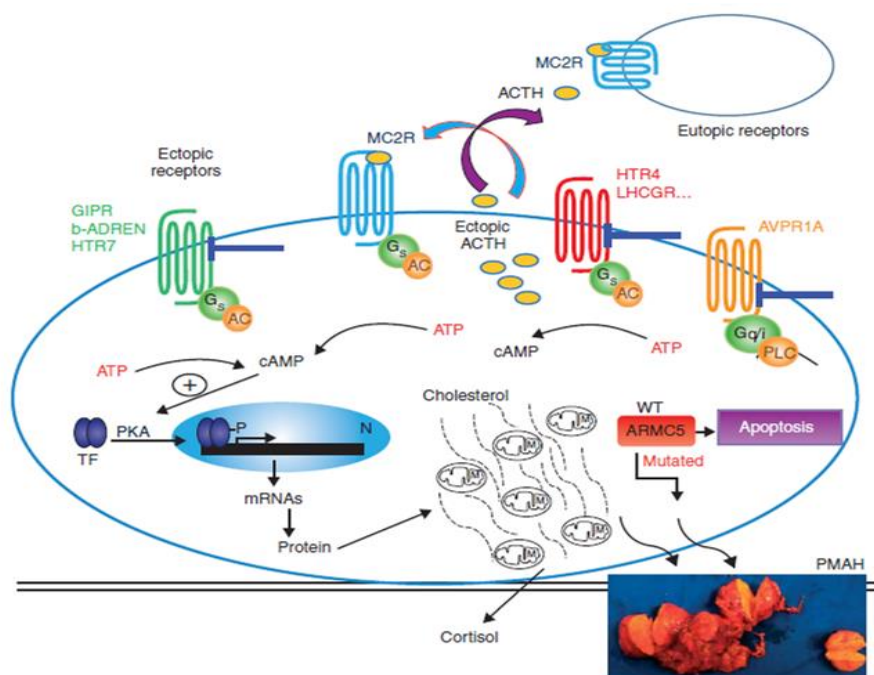
No Ambulatório de Suprarrenal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFM-USP), cerca de 24% dos pacientes (5/21), suspeitos de apresentarem a forma esporádica da PMAH apresentaram

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 familiar 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 Macronodular 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 intrácrico torna as células que compõem os nódulos hiperplásicos independentes da ação do ACTH hipofisário e, portanto, independentes do controle do eixo HPA, o que mantém 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: Frago 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  $\alpha$ -hélices, que foram caracterizadas primeiramente em segmentos de proteínas Armadillo em *Drosophila* (30). As unidades das proteínas ARM repetidas, formam, em conjunto,

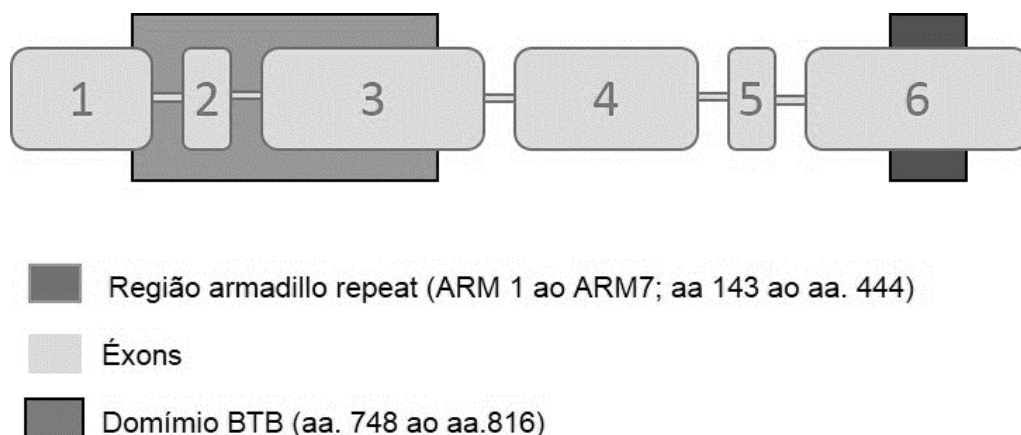
uma super-hélice, que formam uma plataforma versátil que permite interações com outras proteínas, e que por isso apresentam mais de uma função celular. As proteínas ARM em eucariotos, de um modo geral, têm importantes e diversas funções celulares (31).

Uma das proteínas da família Armadillo mais estudada é a  $\beta$ -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 esteroideogênico 1 (*SF1*), de algumas enzimas esteroideogênicas, 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 familiar 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.

## **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 Jossineau 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 hiperplasia macronodular das adrenais. Apresentação de um caso e revisão da literatura. *Arq Bras Endocrinol Metabol*2001. 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  $\beta$ -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 11 $\beta$ -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 serotonin<sub>7</sub> 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.