

BÁRBARA BRITO DA CONCEIÇÃO

**Estudo da expressão das enzimas esteroidogênicas
e dos receptores aberrantes ectópicos na hiperplasia macronodular
adrenal primária de pacientes com e sem mutação no gene *ARMC5***

Dissertação apresentada ao Departamento de
Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2018

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Ciências Morfofuncionais

BÁRBARA BRITO DA CONCEIÇÃO

Estudo da expressão das enzimas esteroidogênicas e dos receptores aberrantes ectópicos na hiperplasia macronodular adrenal primária de pacientes com e sem mutação no gene *ARMC5*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lotfi

São Paulo

2018

Resumo

BRITO, BC. **Estudo da expressão das enzimas esteroidogênicas e dos receptores aberrantes ectópicos na hiperplasia macronodular adrenal primária de pacientes com e sem mutação no gene *ARMC5*. 2018. 61f.**

A hiperplasia adrenocortical macronodular primária (PMAH) é uma causa rara de Síndrome de Cushing (SC). Apresenta como características macronódulos funcionantes em ambas as glândulas suprarrenais e uma produção variável de cortisol. Os nódulos apresentam uma produção ectópica de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) tornando a doença independente do ACTH hipofisário. Estudos independentes mostraram que mutações germinativas no gene *armadillo repeat cointaining 5 (ARMC5)* são uma causa frequente de PMAH. Além dessa mutação parece haver a participação de receptores hormonais ectópicos no córtex suprarrenal, que estimulariam a esteroidogênese e a hiperplasia da glândula. No entanto, os estudos sobre a relação entre o *ARMC5* e a participação dos receptores aberrantes na produção de cortisol são incipientes. Portanto, temos como hipótese que as alterações no gene *ARMC5* podem estar envolvidas no padrão celular e funcional das células que compõem os nódulos hiperplásicos na PMAH. Desta forma, nossos objetivos foram analisar: 1) a proporção de células espongiiformes e compactas em cortes corados com hematoxilina e eosina; 2) a expressão gênica, nas células espongiiformes e proteica de ambas as células, do *ARMC5*, das enzimas esteroidogênicas *StAR*, *3 β HSD2* e *CYP17A1*, dos receptores da vasopressina (*AVP1AR*), serotonina (*5HT4R*) e do peptídeo inibidor gástrico (*GIPR*) e do ACTH ectópico e 3) a expressão do antígeno de proliferação celular, a proteína PCNA, para análise do padrão de proliferação em cortes histológicos de nódulos de hiperplasias de pacientes que apresentam mutações germinativas, mutações germinativas e somáticas ou não mutação no gene *ARMC5*. Os resultados mostraram que os nódulos hiperplásicos são compostos, na sua maioria, por células espongiiformes, cujo padrão foi independente da presença de mutação. A expressão do *ARMC5* nas células espongiiformes foi maior em pacientes com mutação, e os receptores ectópicos apresentaram uma expressão maior no tecido de PMAH em relação à adrenal normal. A reação de imunoistoquímica revelou células positivas para a proteína *ARMC5* e *StAR*, em ambos os tipos celulares, enquanto a enzima *3 β HSD2* foi predominante nas células espongiiformes e a enzima *CYP17A1* nas células compactas. A expressão de *AVP1AR*, *5HT4R*, e do ACTH ectópico foi positiva em ambos os tipos celulares e independente da presença ou não da mutação no gene *ARMC5*, bem como a expressão da proteína PCNA. Portanto, nossos resultados sugerem que a presença ou não de mutações no gene *ARMC5* nas hiperplasias não está envolvida no padrão celular das células que compõem os nódulos. O mesmo para a presença dos receptores *AVP1AR*, *5HT4R* e *GIPR*, do ACTH ectópico e da proteína PCNA. Como conclusão, os resultados dos parâmetros analisados sugerem que as alterações no gene *ARMC5* não estão envolvidas no padrão celular e funcional das células que compõem os nódulos hiperplásicos na PMAH, e podem ter o mesmo grau de importância na formação desses nódulos.

Palavras-chaves: *ARMC5*, Hiperplasia Macronodular Adrenal Primária, Enzimas Esteroidogênicas, Receptores Ectópicos.

Abstract

BRITO, BC. **Study of the expression steroidogenic enzymes and ectopic receptors in macronodular primary adrenal hyperplasia with or without mutation in the ARMC5 gene. 2018. 61f.**

The primary macronodular adrenal hyperplasia (PMAH) is a rare cause of Cushing's Syndrome (SC). It is characterized as macronodules in the adrenal gland and by variable production of cortisol. The nodules present an ectopic production of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) pituitary-independent. Several studies showed that the germ mutations in *armadillo repeat cointaining 5 gene (ARMC5)* are a frequent cause of PMAH. In addition, there is a participation of ectopic hormonal receptors in the adrenal cortex, which promotes steroidogenesis and hyperplasia of the gland. However, studies on a relationship between ARMC5 and aberrant receptor involvement in cortisol production are incipient. Therefore, our hypothesis is that ARMC5 gene may be involved in the cellular and functional pattern of the cells in PMAH. Thus, the objectives were to analyzed: 1) the proportion of spongiform and compact cells in sections stained with hematoxylin and eosin; 2) the gene expression in the spongiform cells and the gene and protein expression in both cells types of the ARMC5, the steroidogenic enzymes StAR, 3 β HSD2 and CYP17A1, and the ectopic receptors of vasopressin (AVP1AR), serotonin (5HT4R) and gastric inhibitory peptide (GIPR) also the ACTH ectopic and 3) the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) that shows the proliferation pattern in patients PMAH that present germline, germinative and somatic mutations or no mutation in ARMC5 gene. We showed that the hyperplastic nodules are mainly composed by spongiform cells independent of the ARMC5 mutation. The expression of ARMC5 in spongiform cells was higher in patients with mutation, and PMAH tissue have a higher expression of the ectopic receptors when compared with normal adrenal. With the immunohistochemical labeling, we observed the ARMC5 and StAR protein expression in both cell types. The 3 β HSD2 enzyme was predominant in spongiform cells and the CYP17A1 enzyme in the compact cells. The expression of AVP1AR, 5HT4R, and ectopic ACTH was positive in both cell types regardless of the presence of the ARMC5 mutation, as well as the expression of the PCNA protein. Therefore, the results suggest that the mutation in ARMC5 is not involved with spongiform and compact cell function. Moreover, the presence of the AVP1AR, 5HT4R and GIPR receptors, the ectopic ACTH and the PCNA protein was not related to the gene mutation. In conclusion, the alterations in the ARMC5 gene are not involved in the cell functional pattern in the PMAH and in the onset of the nodules.

Keywords: ARMC5, Primary Macronodular Adrenal Hyperplasia, Steroidogenic Enzymes, Ectopic Receptors.

Introdução

1.1 A Glândula Suprarrenal

Em humanos, as glândulas suprarrenais estão localizadas na cavidade abdominal em posição retroperitoneal no polo superior de cada rim. São revestidas por uma cápsula conjuntiva e compostas por dois tecidos de origens e funções distintas. A medula adrenal é composta, principalmente, por células poliédricas denominadas de células cromafins, que se organizam em cordões e formam uma densa rede que engloba capilares e vênulas. Este tecido tem sua origem embriológica na neuroectoderme, mais especificamente, nas células da crista neural. A função básica da medula adrenal é sintetizar e secretar adrenalina e noradrenalina após estímulos nervosos. O córtex adrenal deriva da mesoderme da parede abdominal posterior, e é formado por células epitelióides com formato poliédrico. O córtex adrenal adulto é formado por 3 zonas celulares concêntricas, histologicamente bem definidas, que formam a zona glomerulosa (ZG), a zona fasciculada (ZF), e zona reticulada (ZR) (1). A ZG localiza-se na região mais externa do córtex adrenal, imediatamente abaixo da cápsula conjuntiva que envolve a glândula, e suas células dispõem-se em aglomerados arredondados envolvidos por capilares. Essas células são responsáveis pela síntese e secreção de mineralocorticoides, que estão associados com a homeostase dos eletrólitos do plasma sanguíneo. A ZF ocupa 75% do volume total da glândula suprarrenal, e apresenta células poliédricas com grande número de gotículas lipídicas em seu citoplasma. Essas células se organizam em colunas paralelas intercaladas por capilares, e tem como função básica a síntese e secreção de glicocorticoides, cuja produção é regulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). A ZR é a zona mais próxima da medula e suas células dispõem-se em uma estrutura de rede entrelaçada com capilares. Suas células são menores do que as das demais zonas do córtex, contém pequena quantidade de lipídeos em seu citoplasma, e em humanos sintetizam e secretam andrógenos e estrógenos (2). A síntese e secreção dos corticoides produzidos pelas células do córtex adrenal são controlados pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HPA, em inglês, **H**ypothalamic

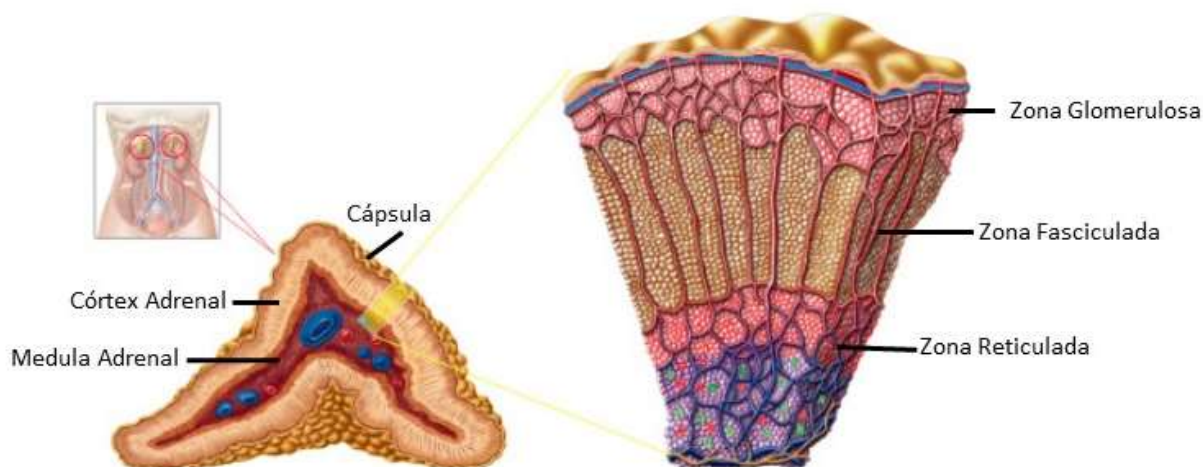


Figura 1: A glândula suprarrenal. (Adaptado de www.gettyimages.com/detail/illustration/anatomy-of-adrenal-gland-cross-section-royalty-free-illustration/188057931)

1.2 O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

A função da glândula suprarrenal é o controle da homeostase do organismo. Estímulos nervosos nas células dos núcleos hipotalâmicos paraventricular e supraóptico estimulam a síntese de vasopressina e o hormônio liberador de corticotropina (CRH)(2). Por meio do sistema porta-hipofisário, o CRH é liberado na adenohipófise e estimula os corticotrofos a sintetizarem e secretarem o ACTH. As células do córtex adrenal apresentam um receptor específico para o ACTH, denominado receptor de melanocortina do tipo 2 (MC2R), que quando ativado pelo ACTH desencadeia uma sinalização para síntese de corticosteroides. ACTH estimula as células do córtex adrenal a sintetizarem esteroides a partir do colesterol, e esse processo envolve a participação de várias enzimas pertencentes à família do citocromo P450 (3). O eixo HPA é regulado por retroalimentação negativa, ou seja, com o aumento da concentração do cortisol na corrente sanguínea, o eixo é bloqueado através da inibição da produção do CRH e do ACTH, respectivamente, no hipotálamo e na adenohipófise (4) Alterações na regulação desse eixo que podem causar uma exposição excessiva e prolongada do organismo aos glicocorticoides secretados pelo córtex suprarrenal causam a Síndrome de Cushing (SC) (5). Descrita pela primeira vez por Harvey Cushing em 1932, a SC é classificada como dependente ou independente do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (6). As lesões unilaterais observadas, como adenomas e

carcinomas correspondem a 90-95% e estão entre as causas da SC independente de ACTH. As lesões bilaterais são menos comuns e incluem a Hiperplasia Micronodular Pigmentosa Primária (PPNAD) e a Hiperplasia Macronodular Adrenal Primária (PMAH).

1.3 A Hiperplasia adrenocortical macronodular primária (PMAH)

Descrita pela primeira em 1964 por Kirschner e colaboradores (7) a PMAH é uma causa rara de SC. Caracteriza-se pela presença de macronódulos funcionantes, geralmente em ambas as suprarrenais, e por uma produção variável, autônoma e sustentada de cortisol. Louiset e colaboradores (2013) mostraram uma produção ectópica de ACTH nos nódulos da PMAH com provável ação autócrina e parácrina, que pode desencadear a cascata esteroidogênica e a produção de cortisol, demonstrando que a doença é independente do ACTH hipofisário (3,7). Até recentemente, a PMAH era detectada quando apresentada sob a forma de SC manifesta, em torno da 5^o ou 6^o década de vida, e com discreta prevalência para o sexo feminino (8). Atualmente, sabe-se que a forma subclínica parece ser a apresentação mais frequente da doença, mas que se encontra sub-diagnosticada (9). Macroscopicamente é representada pela formação de múltiplos nódulos, em ambas adrenais, de coloração amarelada devido à alta concentração lipídica, e com dimensões variáveis, podendo chegar a vários centímetros. O desenvolvimento nodular pode ser não sincrônico, o que dificulta o diagnóstico. A análise microscópica dos nódulos hiperplásicos mostra certa heterogeneidade celular formada por dois grupos celulares distintos (Figura 2). Um grupo é formado por células de citoplasma claro (ricas em lipídios) chamadas de células espongiiformes, e o outro constituído por células compactas com pouco citoplasma (pobre em lipídios), dispostas em estruturas semelhantes a ninhos ou ilhas (10).

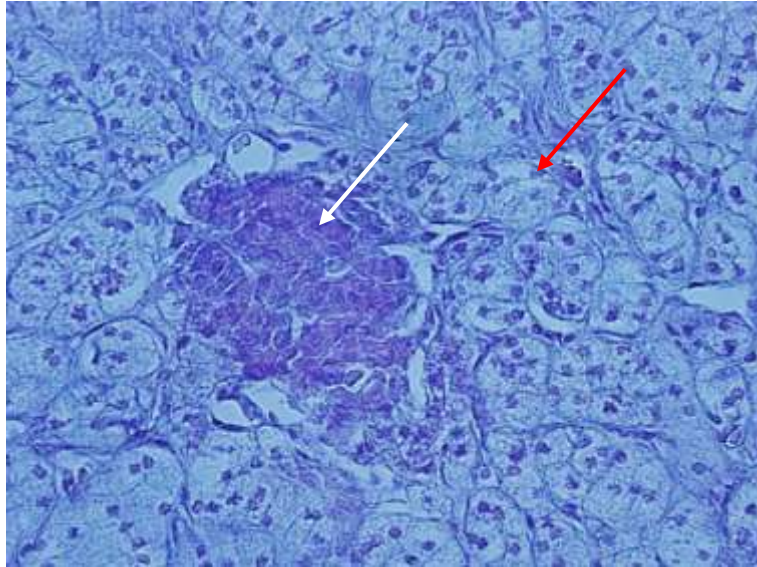


Figura 2: Foto representativa de um nódulo da hiperplasia macronodular primária de paciente do cohort estudado, corado com hematoxilina e eosina (HE). São mostradas células espongiformes, com citoplasma claro rico em lipídeos (seta vermelha), e células compactas agrupadas e pobres de lipídeos (seta branca).

Estudos utilizando hibridização *in situ* mostraram que a enzima 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase do tipo 2 (3 β HSD2) é detectada principalmente nas células espongiformes, enquanto a enzima 17 α -hidroxilase/17,20-liase (CYP17A1) nas células compactas. Esta expressão diferencial ocorre exclusivamente na PMAH (11). As outras enzimas esteroidogênicas estão presentes nos dois tipos celulares, mas frequentemente apresentam uma expressão reduzida. Como a PMAH apresenta esteroidogênese ineficiente, o hipercortisolismo parece estar mais relacionado à hiperplasia das células adrenocorticais (12). Porém não existem relatos na literatura sobre qual a proporção entre células espongiformes e compactas, e se esses tipos celulares são estados funcionais diferentes de um mesmo tipo celular, ou ainda se são células em diferentes estágios de diferenciação celular.

1.4 A esteroidogênese adrenocortical

O ACTH é o principal regulador da síntese de cortisol e de andrógenos pelo córtex adrenal. Em condições fisiológicas, quando a molécula de ACTH se liga ao MC2R, que se encontra no córtex adrenal acoplado à proteína G, ocorre uma alteração da conformação estrutural do MC2R. Essa alteração de conformação do receptor ativa uma proteína G estimulatória (Gs), o que determina a dissociação da subunidade alfa (α) do GDP e sua ligação à guanidina trifosfato (GTP). Uma vez que o GTP está acoplado à subunidade α , essa última assume a conformação ativada, se separa do receptor e do dímero $\beta\gamma$ e ativa o efetor, a adenilato ciclase (AC). A ativação da AC gera cAMP a partir do ATP, que se liga

a domínios específicos da unidade regulatória da proteína quinase dependente de cAMP ou Proteína quinase A (PKA), que libera unidades catalíticas que irão fosforilar diferentes alvos intracelulares. Um dos alvos da PKA é a proteína ligante ao elemento responsivo ao cAMP (CREB), que é um fator de transcrição que estimula a expressão do gene das enzimas esteroidogênicas (9). A via PKA ativada também aumenta a internalização de ésteres de colesterol que é transportado e internalizado na mitocôndria pela ação da proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR) para a produção dos esteroides. As enzimas esteroidogênicas são enzimas do citocromo P450 (CYP) localizadas na mitocôndria, que são enzimas de clivagem da cadeia lateral do colesterol, como as enzimas colesterol desmolase-CYP11A1, CYP11B1-hidroxilase, CYP11B2-hidroxilase, aldosterona sintase. Na mitocôndria o colesterol é clivado primeiramente pela enzima colesterol desmolase-CYP11A1 formando a pregnenolona que se dirige para o retículo endoplasmático liso. No reticulo endoplasmático, a pregnenolona é clivada pela enzima CYP17A1-hidroxilase em 17 α -hidroxipregnenolona, que sofrerá a ação da enzima 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo II (3 β HSD2) dando origem a 17 α -hidroxiprogesterona. Esta, por sua vez, será clivada por outra enzima da família citocromo P450, a CYP21-hidroxilase dando origem ao 11-desoxicortisol. Esse retornará para a mitocôndria, para etapa final, onde sofrerá ação da enzima CYP11B1-hidroxilase que catalisará 11-desoxicortisol em cortisol (Figura 3) (13).

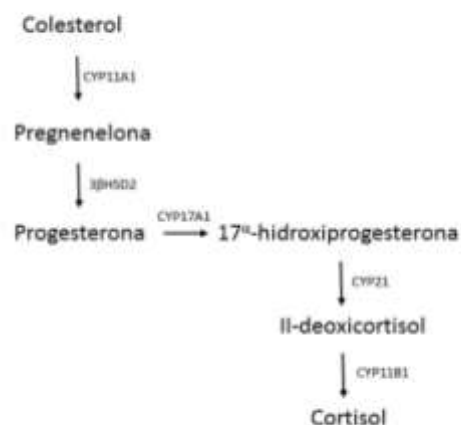


Figura 3: Enzimas e cascata esteroidogênica [Adaptado de Simpson *et al* 1988]

1.5 Os receptores ectópicos

A esteroidogênese pode ser anormalmente regulada pela ativação de receptores hormonais ectópicos e/ou aberrantemente expressos no córtex adrenal (Figura 4), que mimetizam os eventos celulares desencadeados pela ação do ACTH após ativação do receptor MC2R. O conceito de receptores hormonais ilícitos, ectópicos, ou eutópicos, mas aberrantemente expressos nas adrenais, foi proposto pela primeira vez pelo grupo de Robert Ney em 1971 (14). De fato, a esteroidogênese pode ser estimulada por receptores ectópicos que não são expressos em níveis significantes na ZF normal, como o receptor do peptídeo inibitório gástrico (GIPR), receptores beta-adrenérgicos (β -AR), receptores da vasopressina (V2-V3R), receptor da serotonina (5-HT₂) e receptor do glucagon (GCGR) (9). A manifestação clínica desses receptores aberrantes eventualmente pode resultar num certo padrão de SC, como aquele SC-dependente de alimento devido a presença de GIPR, embora na maioria dos casos a presença desses receptores não modifique a apresentação clínica da CS.

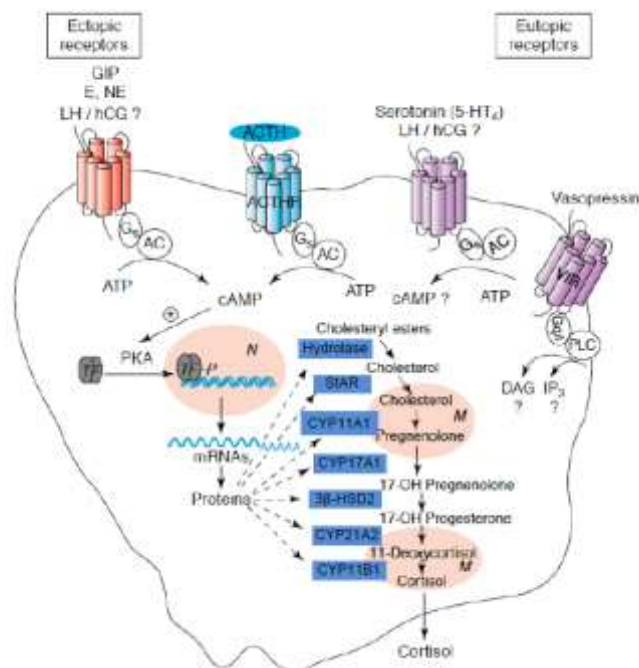


Figura 4: Esteroidogênese do córtex adrenal anormalmente mediada por receptores hormonais eutópicos ou ectópicos. [Adaptado de Lacroix et al., 2001].

Em pacientes diagnosticados com PMAH, é frequente a regulação aberrante da secreção de cortisol que ocorre devido a expressão do receptor de GIP (GIPR), dos

receptores da vasopressina (AVP1AR) e do receptor da serotonina, 5-hidroxitriptamina (5-HT4). Portanto, a esteroidogênese pode ser estimulada por outros hormônios que não o ACTH, como descrito em vários casos de PMAH (15,16).

1.5.1 O Receptor de Peptídeo Inibitório Gástrico (GIPR)

A presença de GIPR foi detectada em células adrenais de pacientes que apresentavam SC-dependente de alimento, mas não naqueles com SC-não dependentes (17). As células isoladas desses pacientes responderam de forma dose-dependente à ação do ACTH e do GIP na ativação da esteroidogênese, enquanto as células adrenais normais responderam apenas ao ACTH. Nesses pacientes, após a ingestão de alimentos, GIP é liberado em concentrações fisiológicas pelas células K do duodeno e do intestino delgado, que se liga ao GIPR ectópico adrenal. Como resultado há aumento supra fisiológico pós-prandiais do cortisol plasmático, que exerce regulação negativa na síntese de CRH e ACTH (Figura 5). Lacroix e colaboradores (1992) mostraram que a incubação de células adrenais provenientes de nódulos de PMAH secretam cortisol *in vitro* mediado por GIP, mas não em células adrenais adultas ou fetais normais ou em outros adenomas (18).

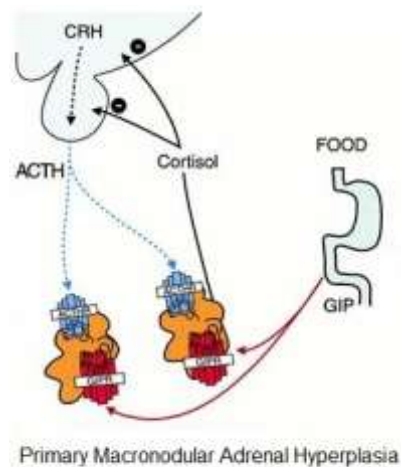


Figura 5: Ilustração do receptor aberrante de GIP (GIPR). [Adaptado de Lacroix *et al* 2001].

1.5.2 Os receptores da Vasopressina (AVP)

As ações da AVP são mediadas por três receptores acoplados à proteína G. Os receptores V1A ou AVP1AR está expresso principalmente nas células de músculo liso vascular, nas suprarrenais, fígado, plaquetas e cérebro (19). O receptor V2 está expresso nos rins (20) e o receptor V3 (V1B) possivelmente nos rins (21). Estudos mostraram que a AVP estimula diretamente o crescimento e a esteroidogênese em células adrenais em

ratos, bovinos, cães e rã (22-25), e a secreção de cortisol de células adrenais humanas normais *in vitro* (25,26), através da ativação do receptor AVP1AR. Lacroix e colaboradores (27) detectaram a regulação do cortisol influenciada pela postura e pela ação da AVP em paciente com PMAH e SC. Em indivíduos normais a AVP aumenta a produção de cortisol estimulando diretamente a secreção de ACTH e indiretamente pela potencialização dos efeitos do CRH (28).

1.5.3 Receptor de Serotonina (5HT4R)

Em células adrenocorticais humanas a serotonina estimula a secreção de cortisol *in vitro* através da ativação do receptor 5HT4 (29). A 5HT4 é um receptor que pode mediar a regulação da produção de corticosteroides nas adrenais por meio de um mecanismo parácrino (30). Este receptor pode ser encontrado principalmente nas células da zona glomerulosa, mas também nas células da zona fasciculada (31).

Além dessas alterações acima descritas um recente e importante achado por dois grupos independentes (32,33) foi a identificação de mutações germinativas e somáticas no gene Armadillo repeat containing 5 (ARMC5) primeiramente em 55% (32) dos casos, e 25% em trabalhos mais recentes (34).

1.7 Armadillo repeat containing 5 (ARMC5)

As proteínas da família Armadillo (32) 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* (35). Uma das proteínas da família Armadillo mais estudadas é a β -catenina (CTNNB1), que é uma proteína associada à caderina, que apresenta interações com outras proteínas. Tem funções relacionadas ao desenvolvimento, à adesão celular e à ativação da sinalização Wnt, regulando a expressão de genes relacionados à proliferação celular (39). Estudos sobre a ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina (34,36,) mostraram um papel importante dessa via no prognóstico de tumores adrenocorticais. Assim como a β -catenina, Assié e colaboradores (35) demonstraram que a proteína ARMC5 leva à morte celular quando o gene *ARMC5* foi transfectado em células da linhagem de carcinoma adrenocortical humana, células H295R. A inativação da proteína devido a mutações inativadoras do gene *ARMC5* levaram à diminuição da expressão do receptor de ACTH, o receptor MC2R, e das enzimas esteroidogênicas adrenais. A descrição de mutações germinativas no gene *ARMC5* em pacientes diagnosticados com PMAH levantou a hipótese da associação desta proteína com o desenvolvimento da doença, em casos esporádicos e

na forma familiar (32,35,). A existência de um segundo evento, isto é, mutação somática nos diferentes nódulos sugere que o *ARMC5* seja um gene supressor de tumor (36), de acordo com a Teoria de Knudson de dois eventos (37). No entanto, nem todos os pacientes apresentam as mutações germinativa e somática ou perda de heterozigose, isto é, há pacientes que apresentam apenas a mutação germinativa. No momento, ainda não é conhecida a relevância do segundo evento para o quadro clínico da doença, o que reforça a necessidade de analisar os grupos de pacientes com PMAH sem mutação, com mutação germinativa e com mutação germinativa e somática, separadamente.

A PMAH é independente do ACTH hipofisário na produção de cortisol e que, além do *ARMC5*, pode haver o envolvimento de outros fatores no seu processo fisiopatológico, a exemplo dos receptores aberrantes, que podem ser importantes na produção de cortisol, mas também na desregulação do processo de proliferação celular. Até o momento não foram realizados estudos comparando as diferentes características descritas na PMAH e a presença da mutação germinativa, germinativas e somáticas e sem mutação no gene *ARMC5* quanto a proporção de células espongiiformes e compactas; pois ainda não foram descritas a proporção desses tipos celulares na PMAH e qual o impacto dessas na síntese do cortisol. Além disso, quais desses tipos celulares expressam as enzimas, StAR, 3 β HSD2 e CYP17A1 e quais são os receptores e ACTH ectópico expressos nesses tipos celulares. Portanto, nesse trabalho temos como hipótese que a presença ou não da mutação do gene *ARMC5* nas hiperplasias pode estar envolvida no padrão celular e funcional das células que compõem os nódulos hiperplásicos.

Conclusão

Como conclusão, da análise morfológica e funcional das adrenais de pacientes diagnosticados com PMAH, portadores ou não de mutações no gene *ARMC5*, temos que:

- Os nódulos de PMAH são compostos majoritariamente de células espongiformes, independente da presença e do tipo de mutação.
- A mutação no gene *ARMC5* não parece estar relacionada com a expressão da proteína StAR, e das enzimas esteroidogênicas 3 β HSD2 e CYP17A1.
- Os níveis de mRNA dos receptores ectópicos estão aumentados em adrenal de pacientes com PMAH, independente da presença de mutação.
- Pode haver uma relação entre a presença do receptor de serotonina 5HT4 em pacientes de PMAH e a mutação no gene *ARMC5*.
- O ACTH ectópico detectado nas adrenais de pacientes com PMAH ocorre independentemente da presença de mutação no gene *ARMC5*.
- Células espongiformes e compactas apresentam o mesmo potencial de proliferação, que independe da mutação no gene *ARMC5*.

8.Referências

1. Junqueira, L.C.U.; Carneiro, J. Histologia básica. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004
2. Orth,D. N; Kovascw. J. The adrenal córtex. In Wilson , J. D; Foster, D. J; Kronenberg, H. M; Larsen, P.R; Willians textbook of endrocrinology. 9th ed.Philadelphia Saunders Book Company, 1998. p. 517-664
3. Write, A.; Gibson, S. ACTH precursors: biological significance and clinical relevance. Clin. Endocrinol. (Oxf.), v. 48, n.3, p.251-255, 1998
4. Aguilera G. Regulation of Pituitary Acth-Secretion during Chronic Stress. Front Neuroendocrin. 1994;15(4):321-50.
5. 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.
6. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. Lancet 2006; 362:1605–1617.
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. Lacroix A, Feelders RA, Stratakis CA, Nieman LK. Cushing's syndrome. The lancet. 2015 Aug 29;386(9996):913-27.
9. Lacroix A. ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2009;23(2):245-59.
10. 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
11. Bourdeau I, Stratakis CA. Cyclic AMP-dependent signaling aberrations in macronodular adrenal disease. Ann N Y Acad Sci. 2002;968:240-55.
12. 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.
13. Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. Endocrine Reviews. 1988 Aug 1;9(3):295-318.

14. Schorr I, Ney RL. Abnormal hormone responses of an adrenocortical cancer adenyl cyclase. *J Clin Invest* 1971;50(6):1295-300.
15. Lacroix A, Tremblay J, Rousseau G, Bouvier M, Hamet P. Propranolol therapy for ectopic beta-adrenergic receptors in adrenal Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 1997 337:1429–1434
16. Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Feuilloley M, Hery F, Grise P, Raynaud G, Verhofstad AA, Wolf LM, Vaudry H. Serotonin- induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin4 receptor subtype. *Neuroscience* 1992 47:999–1007
17. Lacroix A, Baldacchino V, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J. Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2004 Oct 1;15(8):375-82.
18. Lacroix A, Bolte E, Tremblay J, Dupre J, Poitras P, Fournier H, et al. Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion – a new cause of Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 1992;327(14):974-80.
19. Thibonnier M, Auzan C, Madhun Z, Wilkins P, Berti-Mattera L, Clauser E. Molecular cloning, sequencing, and functional expression of a cDNA encoding the human V1a vasopressin receptors. *J Biol Chem* . 1994 269:3304–3310.
20. Birnbaumer M, Seibold A, Gilbert S, et al. Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. *Nature*. 1992 357:333–335.
21. De Keyser Y, Auzan C, Lenne F, et al. Cloning and characterization of the human V3 pituitary vasopressin receptor. *FEBS Lett* . 1994 356:215–220.
22. Payet N, Deziel Y, Lehoux JG. Vasopressin: a potent growth factor in adrenal glomerulosa cells in culture. *J Steroid Biochem* . 1984 20:449–454.
23. Brooks VL, Blakemore LJ. Vasopressin: a regulator of adrenal glucocorticoid production? *Am J Physiol*. 1989 256:E566–E572.
24. Larcher A, Delarue C, Idres S, et al. Identification of vasotocin-like immunoreactivity in chromaffin cells of the frog adrenal gland: effect of vasotocin on corticosteroid secretion. *Endocrinology* . 1989 125:2691–2700.
25. Bird IM, Nicol M, Williams BC, Walker SW. Vasopressin stimulates cortisol secretion and phosphoinositide catabolism in cultured bovine adrenal fasciculata/reticularis cells. *J Mol Endocrinol* . 1990 5:109–116.

26. Perraudin V, Delarue C, Lefèbvre H, Contesse V, Kuhn J-M, Vaudry, H. Vasopressin stimulates cortisol secretion from human adrenocortical tissue through activation of V1 receptors. *J Clin Endocrinol Metab* . 1993 76:1522–1528.
27. Andre Lacroix, Johanne Tremblay, Rhian M. Touyz, Li Yuan Deng, Richard Lariviere, Jean R. Cusson, Ernesto L. Schiffrin, Pavel Hamet; Abnormal Adrenal and Vascular Responses to Vasopressin Mediated by a V1-Vasopressin Receptor in a Patient with Adrenocorticotropin-Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia, Cushing's Syndrome, and Orthostatic Hypotension. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82 (8): 2414-2422. doi: 10.1210/jcem.82.8.4140
28. Nieman L, Cutler Jr GB. Cushing's syndrome. In: De Groot LJ, ed. *Endocrinology*. Philadelphia: Saunders; 1995 1741–1770.
29. Bourdeau I, D'amour P, Hamet P, Boutin JM, Lacroix A. Aberrant membrane hormone receptors in incidentally discovered bilateral macronodular adrenal hyperplasia with subclinical Cushing's syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001 Nov 1;86(11):5534-40.)
30. Lefebvre, H., Contesse, V., Delarue, C., Vaudry, H., & Kuhn, J. M.. Serotonergic regulation of adrenocortical function. *Hormone and metabolic research*, 1998 30(06/07), 398-403
31. Lefebvre, H., Contesse, V., Delarue, C., Feuilloley, M., Hery, F., Grise, P., ... & Vaudry, H. Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin4 receptor subtype. *Neuroscience*, 1992 47(4), 999-1007.
32. Assié, G., Libé, R., Espiard, S., Rizk-Rabin, M., Guimier, A., Luscap, W., ... & Rodriguez, S. ARMC5 mutations in macronodular adrenal hyperplasia with Cushing's syndrome. *New England Journal of Medicine*, 2013 369(22), 2105-2114.
33. Faucz FR, Zilbermint M, Lodish MB, Szarek E, Trivellin G, Sinaii N, Berthon A, Libé R, Assié G, Espiard S, Drougat L. Macronodular adrenal hyperplasia due to mutations in an armadillo repeat containing 5 (ARMC5) gene: a clinical and genetic investigation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014 Jun 1;99(6):E1113-9.
34. Alencar GA, Lerario AM, Nishi MY, Mariani BM, Almeida MQ, Tremblay J, Hamet P, Bourdeau I, Zerbini MC, Pereira MA, Gomes GC. ARMC5 mutations are a frequent cause of primary macronodular adrenal Hyperplasia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014 Aug 1;99(8):E1501-9.

35. 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;jc20134280
36. 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.
37. Knudson, A. G. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2001 1(2), 157.
38. Slooten HV, Schaberg A, Smeenk D, Moolenaar AJ. Morphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer*. 1985 Feb 15;55(4):766-73.
39. Dobbie JW. Adrenocortical nodular hyperplasia: the ageing adrenal. *The Journal of pathology*. 1969 Sep;99(1):1-8./
40. Bisi H, Ruggeri GB, Alves VAF, Kanamura CT, Longatto A, Yamada F, et al. Morphological and immunohistochemical studies of normal adrenal gland. *Braz J Morphol Sci* 1999;16:33-8.)
41. Fragoso MC, Alencar GA, Lerario AM, Bourdeau I, Almeida MQ, Mendonca BB, Lacroix A. Genetics of primary macronodular adrenal hyperplasia. *Journal of Endocrinology*. 2015 Jan 1;224(1):R31-43.
42. Faucz FR, Zilbermint M, Lodish MB, Szarek E, Trivellin G, Sinaii N, Berthon A, Libé R, Assié G, Espiard S, Drougat L. Macronodular adrenal hyperplasia due to mutations in an armadillo repeat containing 5 (ARMC5) gene: a clinical and genetic investigation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014 Jun 1;99(6):E1113-9.
43. Gagliardi L, Schreiber AW, Hahn CN, Feng J, Cranston T, Boon H, Hotu C, Oftedal BE, Cutfield R, Adelson DL, Braund WJ. ARMC5 mutations are common in familial bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014 Sep 1;99(9):E1784-92.
44. Espiard S, Drougat L, Libé R, Assié G, Perlemoine K, Guignat L, Barrande G, Brucker-Davis F, Doullay F, Lopez S, Sonnet E. ARMC5 mutations in a large cohort of primary macronodular adrenal hyperplasia: clinical and functional consequences. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2015 Jun 1;100(6):E926-35. Berthon A, Faucz F, Bertherat J, Stratakis CA. Analysis of ARMC5 expression in human tissues. *Molecular and cellular endocrinology*. 2017 Feb 5;441:140-5.
45. Hu, Y., Lao, L., Mao, J., Jin, W., Luo, H., Charpentier, T., ... & Lamarre, A. Armc5 deletion causes developmental defects and compromises T-cell immune responses. *Nature communications*, 2017, 8, 13834.

46. 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.
47. Cavalcante IP, Nishi M, Zerbini MC, Almeida MQ, Brondani VB, de Arruda Botelho ML, Tanno FY, Srougi V, Chambo JL, Mendonca BB, Bertherat J. The role of ARMC5 in human cell cultures from nodules of primary macronodular adrenocortical hyperplasia (PMAH). *Molecular and cellular endocrinology.* 2018 Jan 15;460:36-46.
48. Koizumi S, Beniko M, Ikota A, et al. Adrenocorticotrophic hormone-independent bilateral adrenocortical macronodular hyperplasia: a case report and immunohistochemical studies. *Endocr J* 1994;41(4):429–35.
49. Wada N, Kubo M, Kijima H, Ishizuka T, Saeki T, Koike T, Sasano H. Adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenocortical hyperplasia: immunohistochemical studies of steroidogenic enzymes and post-operative course in two men. *European journal of endocrinology.* 1996 May 1;134(5):583-7.
50. Morioka M, Ohashi Y, Watanabe H, Komatsu F, Jin TX, Suyama B, Tanaka H. ACTH-Independent Macronodular Adrenocortical Hyperplasia (AIMAH). *Endocrine journal.* 1997;44(1):65-72
51. Sasano H, Suzuki T, Nagura H. ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia: immunohistochemical and in situ hybridization studies of steroidogenic enzymes. *Mod Pathol* 1994;7:215-9
52. Schorr I, Ney RL. 1971 Abnormal hormone responses of an adrenocortical cancer adenyl cyclase. *J Clin Invest.* 50:1296–1300./ Hingshaw HT, Ney RL. Abnormal control in the neoplastic adrenal cortex. In: McKerns KW,ed. *Hormones and cancer.* New York: Academic Press; 1974, 309–327
53. Williams LT, Gore TB, Lefkowitz RJ. Ectopic β -adrenergic receptor binding sites. *J Clin Invest.* 1977, 59:319–324. /
54. Millington DS, Golder MP, Cowley T, London D, Roberts H, Butt WR, Griffiths K. In vitro synthesis of steroids by a feminising adrenocortical carcinoma: effect of prolactin and other protein hormones. *Acta endocrinologica.* 1976 Jun 1;82(2):561-71./
55. Mircescu H, Jilwan J, N' Diaye N, Bourdeau I, Tremblay J, Hamet P, Lacroix A. Are ectopic or abnormal membrane hormone receptors frequently present in adrenal Cushing's syndrome?. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2000 Oct 1;85(10):3531-6./

56. Hirata Y, Uchihashi M, Sueoka S, Matsukura S, Fujita T. Presence of ectopic β -adrenergic receptors on human adrenocortical cortisol-producing adenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1981 Nov 1;53(5):953-7.
57. Katz MS, Kelly TM, Dax EM, Pineyro MA, Patilla JS, Gregerman RI. Ectopic β -adrenergic receptors coupled to adenylate cyclase in human adrenocortical carcinomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1985 May 1;60(5):900-9.
58. Leinonen P, Ranta T, Slegberg R, Pelkonen R, Heikkilä P, Kahri A. Testosterone-secreting virilizing adrenal adenoma with human chorionic gonadotrophin receptors and 21-hydroxylase deficiency. *Clinical endocrinology*. 1991 Jan;34(1):31-5./ Willenberg HS, Stratakis CA, Marx C, Ehrhart-Bornstein M, Chrousos GP, Bornstein SR. Aberrant interleukin-1 receptors in a cortisol-secreting adrenal adenoma causing Cushing's syndrome. *New England Journal of Medicine*. 1998 Jul 2;339(1):27-31.
59. Hamet P, Laroche P, Franks DJ, Cartier P, Bolte E. Cushing syndrome with food-dependent periodic hormonogenesis. *Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale*. 1987 Nov;10(6):530-3.
60. Lacroix A, Bolté E, Tremblay J, Dupré J, Poitras P, Fournier H, Garon J, Garrel D, Bayard F, Taillefer R, Flanagan RJ. Gastric Inhibitory Polypeptide–Dependent Cortisol Hypersecretion—A New Cause of Cushing's Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 1992 Oct 1;327(14):974-80.
61. Reznik Y, Allali-Zerah V, Chayvialle JA, Leroyer R, Leymarie P, Travert G, Lebrethon MC, Budi I, Balliere AM, Mahoudeau J. Food-dependent Cushing's syndrome mediated by aberrant adrenal sensitivity to gastric inhibitory polypeptide. *New England Journal of Medicine*. 1992 Oct 1;327(14):981-6.)
62. Perraudin VE, Delarue CA, De Keyser YV, Bertagna X, Kuhn JM, Contesse V, Clauser E, Vaudry H. Vasopressin-responsive adrenocortical tumor in a mild Cushing's syndrome: in vivo and in vitro studies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1995 Sep 1;80(9):2661-7.
63. Horiba NO, Suda TO, Aiba MO, Naruse MI, Nomura KA, Imamura MA, Demura HI. Lysine vasopressin stimulation of cortisol secretion in patients with adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1995 Aug 1;80(8):2336-41.
64. Lacroix A, Tremblay J, Touyz RM, Deng LY, Lariviere R, Cusson JR, Schiffrin EL, Hamet P. Abnormal adrenal and vascular responses to vasopressin mediated by a V1-vasopressin receptor in a patient with adrenocorticotropin-independent macronodular

- adrenal hyperplasia, Cushing's syndrome, and orthostatic hypotension. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1997 Aug 1;82(8):2414-22.
65. Iida K, Kaji H, Matsumoto H, Okimura Y, Abe H, Fujisawa M, Kamidono S, Chihara K. Adrenocorticotrophin-independent macronodular adrenal hyperplasia in a patient with lysine vasopressin responsiveness but insensitivity to gastric inhibitory polypeptide. *Clinical endocrinology*. 1997 Dec;47(6):739-45.
66. Arnaldi G, Gasc JM, de Keyzer Y, Raffin-Sanson ML, Perraudin V, Kuhn JM, Raux-Demay MC, Luton JP, Clauser E, Bertagna X. Variable expression of the V1 vasopressin receptor modulates the phenotypic response of steroid-secreting adrenocortical tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1998 Jun 1;83(6):2029-35.)
67. Miyachil, K., Fritzler, M. J., Tan, E.M. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol.*, v. 121, n. 6, p. 2228-34, 1978.
68. Lacroix A, Bolte E, Tremblay J, Dupre J, Poitras P, Fournier H, et al. Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion – a new cause of Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 1992;327(14):974-80. / Reznik Y, Allali-Zerah V, Chayvialle JA, Leroyer R, Leymarie P, Travert G, et al. Food-dependent Cushing's syndrome mediated by aberrant adrenal sensitivity to gastric inhibitory polypeptide. *N Engl J Med* 1992;327 (14):981-6.
69. Shenker Y., Gross M. D. and Grekin R. J. Central serotonergic stimulation of aldosterone secretion. *J. clin. Invest.* 1985 76, 1485-1490.
70. Racz K., Wolf I., Kiss R., Lada G., Vida S. and Glaz E. Corticosteroidogenesis by isolated human adrenal cells: effect of serotonin and serotonin antagonists. *Experientia* 1979 35, 1532-1534
71. N'diaye N, Hamet P, Tremblay J, Boutin JM, Gaboury L, Lacroix A. Asynchronous development of bilateral nodular adrenal hyperplasia in gastric inhibitory polypeptide-dependent Cushing's syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999 Aug 1;84(8):2616-22.
72. Swords, F. M., Aylwin, S., Perry, L., Arola, J., Grossman, A. B., Monson, J. P., & Clark, A. J. L. The aberrant expression of the gastric inhibitory polypeptide (GIP) receptor in adrenal hyperplasia: does chronic adrenocorticotropin exposure stimulate up-regulation of GIP receptors in Cushing's disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2005 90(5), 3009-3016.
73. Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocrine reviews*. 1998 Apr 1;19(2):101-43.

74. Pereira MA, Araújo RS, Bisi H. Síndrome de Cushing associada à hiperplasia macronodular das adrenais: apresentação de um caso e revisão da literatura. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2001 Dec;45(6):619-27.
75. 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.
76. Zhang Q, Dou J, Gu W, Yang G, Mu Y, Lu J. In Silico Analyses Reveals Nuclear Asymmetry of Spongiocytes and Compact Cells of Adrenocorticotrophic Hormone-Independent Macronodular Adrenocortical Hyperplasia. *The American journal of the medical sciences*. 2014 May 1;347(5):400-5.

