

**Maria Luiza Anhaia de Arruda Botelho**

**Hiperplasia adrenocortical macronodular primária: estudo  
morfológico, imuno-histoquímico e sua correlação com as alterações  
genético-moleculares**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para a  
obtenção de título de Doutora em Ciências

Programa: Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Claudia  
Nogueira Zerbini

**São Paulo  
2022**

**Maria Luiza Anhaia de Arruda Botelho**

**Hiperplasia adrenocortical macronodular primária: estudo  
morfológico, imuno-histoquímico e sua correlação com as alterações  
genético-moleculares**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para a  
obtenção de título de Doutora em Ciências

Programa: Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Claudia  
Nogueira Zerbini

**São Paulo  
2022**

**Este trabalho foi realizado no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em parceria com a Unidade de Endocrinologia e Metabolismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e contou com apoio financeiro da FAPESP (processos: 2015/50192-9 e 2017/11495-1)**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Botelho, Maria Luiza Anhaia de Arruda  
Hiperplasia adrenocortical macronodular primária  
: estudo morfológico, imuno-histoquímico e sua  
correlação com as alterações genético-moleculares /  
Maria Luiza Anhaia de Arruda Botelho. -- São Paulo,  
2022.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Patologia.  
Orientadora: Maria Claudia Nogueira Zerbini.

Descritores: 1.Apoptose 2.Glândulas suprarrenais  
3.Hiperplasia 4.Imuno-histoquímica 5.ARMCS 6.Genes  
supressores de tumor 7.Proliferação de células  
8.Ciclo celular

USP/FM/DBD-318/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## **DEDICATÓRIA**

---

Dedico esta tese à minha mãe e à minha madrinha que sempre foram uma grande  
inspiração durante esse percurso de aprendizagem

## **AGRADECIMENTOS**

---

Agradeço ao Universo misterioso e perfeito pela consciência que nos permite escolher, pelos desafios que nos fazem crescer e pela compreensão que aqui estamos para aprender e melhorar.

A minha família, pelo amor e por serem meu alicerce com o qual pude caminhar, descobrir horizontes e contribuir com a minha bagagem.

A minha orientadora, Profa. Dra. Maria Claudia Nogueira Zerbini, por acreditar em meu potencial, por estar junto compartilhando e orientando o trabalho e pela amizade e compreensão dos momentos que passei.

A Profa. Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso e a todos os médicos e pesquisadores do Departamento de Endocrinologia e Metabologia do HCFMUSP, por compartilharem seus conhecimentos imprescindíveis à realização deste estudo.

A Dra. Raquel Ferrari Marchesi que incentivou e colaborou para o meu ingresso nesse doutorado.

Aos Professores Prof. Dr. Chin Jia Lin, Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi e Prof. Dr. Adhemar Longatto Filho, pela participação e importante contribuição em minha Banca de Qualificação.

A FAPESP pelo apoio financeiro para meu desenvolvimento profissional.

A Angela Batista Gomes dos Santos do Laboratório de imuno-histoquímica do Departamento de Patologia da FMUSP pelo acolhimento, generosidade e excelência técnica na realização das reações imuno-histoquímicas que tornaram possível a concretização desse trabalho.

A Alda Wakamatsu e a todos os profissionais do LIM14 – Patologia Hepática, Faculdade de Medicina da USP, pela colaboração e participação fundamental na realização de parte das reações imuno-histoquímicas deste trabalho.

A Dra Sheila Friedrich Faraj pela ajuda em coletar amostras de glândulas suprarrenais utilizadas no grupo controle.

A Dani pelo apoio incondicional, carinho e compreensão nos momentos mais difíceis e desafiadores.

A todos meus amigos por entenderem minhas ausências em momentos que não pude estar junto para compartilhar.

“Se não houver frutos, valeu a beleza das flores;  
se não houver flores, valeu a sombra das folhas;  
se não houver folhas, valeu a intenção da semente”

*Henfil*

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

## Sumário

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	A glândula suprarrenal .....	2
1.2	A glândula suprarrenal em situações patológicas.....	7
1.3	Hipercortisolismo e síndrome de Cushing (SC).....	8
1.4	A hiperplasia adrenocortical macronodular primária (PMAH).....	12
1.4.1	Quais os critérios diagnósticos para essa entidade? .....	13
1.4.2	Fisiopatologia da PMAH: o que se conhece no momento e quais as questões relevantes a serem respondidas?.....	15
1.4.2.1	Regulação anormal do córtex adrenal por receptores hormonais aberrantes ...	16
1.4.2.2	Mutação ativadora do gene do receptor do ACTH ( <i>MC2R</i> ) .....	17
1.4.2.3	Mutação ativadora do gene da subunidade alfa da proteína Gs ( <i>GNAS</i> ).....	18
1.4.2.4	Variantes alélicas do gene da fosfodiesterase 11A ( <i>PDE11A</i> ).....	18
1.4.2.5	Produção intra-adrenal de ACTH.....	18
1.4.2.6	O papel da mutação do gene <i>ARMC5</i> .....	19
1.4.2.7	Associação da PMAH a síndromes genéticas .....	20
1.4.3	Porque a glândula se torna hiperplásica na PMAH? – o papel da proliferação e de apoptose .....	21
1.4.4	Esteroidogênese: o papel das enzimas CYP11B1, CYP11B2 e do fator de transcrição SF1 .....	23
1.5	Tratamento.....	24
2.	OBJETIVOS.....	25
3.	METODOLOGIA .....	27
3.1	Aspectos éticos .....	28
3.2	Casuística.....	28
3.3	Avaliação clínica .....	29
3.4	Avaliação morfológica .....	29
3.4.1	Avaliação macroscópica.....	29
3.4.2	Avaliação microscópica .....	30
3.5	Exame imuno-histoquímico .....	32
3.5.1	Análise imuno-histoquímica.....	34
3.6	Análise estatística .....	35
4.	RESULTADOS .....	36
4.1	Achados clínicos e demográficos .....	37
4.2	Achados macroscópicos .....	39
4.3	Achados microscópicos.....	41

4.4	Imuno-histoquímica.....	53
4.4.1	Proliferação e apoptose .....	54
4.4.2	Apoptose: BCL2 e BAX.....	55
4.4.3	Esteroidogênese.....	56
4.4.4	ACTH .....	58
4.4.5	<i>ARMC5</i> .....	59
5.	DISCUSSÃO.....	62
6.	CONCLUSÕES.....	74
7.	REFERÊNCIAS .....	77

## Lista de abreviaturas e símbolos

<	menor que
=	igual a
>	maior que
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
<sup>18</sup> F-FDG	fluordesoxiglicose marcada
<sup>18</sup> F-FDG-PET/CT	tomografia por emissão de pósitrons com fluordesoxiglicose marcada, acoplada à tomografia computadorizada
3B-HSD2	3beta-hidroxiesteroide desidrogenase do tipo 2
5-HT	5-hidroxitriptamina
A	alveolar
AC	adenilato ciclase
ACTH	<i>adrenocorticotropic hormone</i>
ACTHR	receptor do hormônio adrenocorticotrófico
AMPc	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
APCCs	<i>aldosterone producing cell clusters</i>
APD	adrenalectomia parcial direita
APE	adrenalectomia parcial esquerda
<i>ARMC5</i>	<i>armadillo repeat containing protein 5</i>
ATD	adrenalectomia total direita
ATE	adrenalectomia total esquerda
BSA	solução de albumina bovina
CAC	crescimento adrenal compensatório
CAPPESQ	comitê de Ética em Pesquisa
CCNE1	ciclina E1
CGA	campo de grande aumento
cm	centímetro
CRH	hormônio estimulador da corticotrofina
CUL	culina 3
CYP11A1	colesterol desmolase
CYP11B1	11B-hidroxilase
CYP17A1	17alfa-hidroxilase/17,20-liase
CYP21A2	21-hidroxilase
D	difuso
DAG	diacilglicerol
DAMB	doença adrenocortical macronodular bilateral
DNA	ácido desoxirribonucleico
E	epinefrina
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EEC	extensão extracapsular
EETs	ácidos epoxieicosatrienóicos

<i>et al.</i>	e outros
F-FDG	fluordesoxiglicose marcada
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FAPESP	fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo
FasL	ligante proteína Fas
FGF2	fator de crescimento de fibroblastos 2
g	grama
GE	germinativa esporádica
GF	germinativa familiar
GIP	peptídio inibitório gástrico
GNAS	subunidade alfa da proteína Gs
H&E	hematoxilina & Eosina
HA	hemorragia antiga
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
hCG	gonadotrofina coriônica humana
HHA	hipotálamo-hipófise-adrenal
HS	hipercortisolismo sub-clínico
IP3	inositol trifosfato
<i>KDM1A</i>	<i>lysine demethylase 1 gene</i>
L	litro
LH	hormônio luteinizante
M	mutação
M-	grupo sem mutação
M+	grupo com mutação
MA	metaplasia adiposa
<i>MC2R</i>	<i>melanocortin 2 receptor gene</i>
MC2R	receptor do ACTH
mcg/dL	micrograma por decilitro
mg	miligrama
mg/dL	miligrama por decilitro
mg/mL	miligrama por mililitro
mL	mililitro
MM	metaplasia mieloide
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MTO	metaplasia teca-ovariana
N/A	não avaliável
NE	norepinefrina
NEM 1	neoplasia endócrina múltipla tipo 1
NGS	<i>next-generation sequencing</i>
nmol/L	nanomol por litro

NO	nódulo oncocítico
NR5A1	<i>nuclear receptor subfamily 5 group A member 1</i>
°C	graus Celsius
P	pseudoglandular
PBS	solução salina tamponada com fosfatos
PDE11A	fosfodiesterase 11A
PET	tomografia por emissão de pósitrons
PET/CT	tomografia por emissão de pósitrons acoplada à tomografia computadorizada
pg/mL	picograma por mililitro
pH	potencial hidrogeniônico
PKA	proteína cinase A
PLC	fosfolipase C
PMAH	<i>Primary macronodular adrenocortical hyperplasia</i>
RNA	ácido ribonucleico
RNM	ressonância nuclear magnética
RT-PCR	transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real
SC	síndrome de Cushing
SE	somática esporádica
SF1	proteína fator 1 esteroideogênica
StAR	proteína reguladora aguda da esteroideogênese
SUVmax	valor padrão de captação máxima
T	trabecular
TC	tomografia computadorizada
TF	fatores de transcrição
TNF	fator de necrose tumoral
TTO	tratamento
v/v	volume de soluto / volume de solução
V1R	receptor V1 da vasopressina
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VO	via oral
vs	<i>versus</i>

## Lista de figuras

Figura 1 - Zonas do córtex e da medular da adrenal com seus respectivos hormônios secretados.....	4
Figura 2 - Córtex adrenal na coloração histoquímica de reticulina.....	5
Figura 3 - Representação esquemática das glândulas adrenais e sua localização anatômica.....	6
Figura 4 - Algoritmo para o diagnóstico clínico de hipercortisolismo.....	11
Figura 5 - TC e <sup>18</sup> F-FDG-PET/CT.....	15
Figura 6 - Regulação anormal do córtex adrenal mediada por receptores hormonais aberrantes.....	17
Figura 7 - O gene <i>ARMC5</i> .....	20
Figura 8 - Síntese de aldosterona e cortisol.....	23
Figura 9 - Superfície de corte de produto de adrenalectomia direita .....	41
Figura 10 - Padrões morfológicos citoarquiteturais .....	43
Figura 11 - Área de extensão extracapsular .....	45
Figura 12 - Adrenalite .....	47
Figura 13 - Metaplasia adiposa.....	48
Figura 14 - Metaplasia mieloide.....	49
Figura 15 - Mielolipoma.....	49
Figura 16 - Calcificações distróficas .....	50
Figura 17 - Células eosinofílicas, cariomegalia, grau nuclear de Fürhman e pigmento .....	50
Figura 18 - Mucina destacada pela coloração histoquímica de <i>Alcian-blue</i> .....	51
Figura 19 - Metaplasia tecal ovariana .....	51
Figura 20 - Mitose e índice de proliferação celular (Ki-67).....	53
Figura 21 - Imunoexpressão de BCL-2 na camada medular da adrenal. ....	55
Figura 22 - Imunoexpressão de BAX e BCL-2.....	56
Figura 23 - Imunoexpressão de SF-1.....	57
Figura 24 - Imunoexpressão de CYP11B1 e CYP11B2 em um caso controle .....	58
Figura 25 - Imunoexpressão de ACTH na região medular da adrenal na PMAH.....	59
Figura 26 - Negatividade para ACTH nas células adrenocorticais .....	59
Figura 27 - Imunoexpressão de <i>ARMC5</i> .....	60

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Causas endógenas de síndrome de Cushing .....	9
Tabela 2 - Características clínicas da síndrome de Cushing.....	10
Tabela 3 - Associação entre extensão extracapsular e padrão único ou misto .....	45
Tabela 4 - Associação entre extensão extracapsular e padrão morfológico citoarquitetural.....	46
Tabela 5 - Relação entre as variáveis clínicas, macroscópicas e microscópicas e o <i>status</i> mutacional (M) .....	52
Tabela 6 - Índice mitótico (no. mitoses/50CGA) e índice proliferativo Ki-67 (%).....	54
Tabela 7 - Médias e respectivos desvios-padrão das variáveis e índice proliferativo Ki-67 (%) segundo o <i>status</i> de mutação .....	54
Tabela 8 - Médias e respectivos desvios-padrão da marcação de Ki-67 segundo o grupo (controle ou casos).....	55
Tabela 9 - Número e porcentagem de pacientes com PMAH segundo a presença de mutação e imunexpressão de CYP11B1, CYP11B2, ACTH e ARMC5 ...	60
Tabela 10 - Número e porcentagem de pacientes segundo os grupos (controle ou casos) e imunexpressão de CYP11B1, CYP11B2, ACTH e ARMC5 .....	61

## Lista de Quadros

Quadro 1 - Protocolo anátomo patológico – Macroscopia .....	30
Quadro 2 - Protocolo anátomo patológico – Microscopia .....	31
Quadro 3 - Informações técnicas sobre os anticorpos primários utilizados.....	34
Quadro 4 - Características clínicas e demográficas .....	38
Quadro 5 - Achados macroscópicos.....	40
Quadro 6 - Achados microscópicos .....	42

## Resumo

Botelho MLAA. *Hiperplasia adrenocortical macronodular primária: estudo morfológico, imuno-histoquímico e sua correlação com as alterações genético-moleculares* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

**Introdução:** Descrita em 1964 por Kirschner *et al*, a hiperplasia adrenocortical macronodular primária (*Primary Macronodular Adrenocortical Hyperplasia* - PMAH) é uma causa rara de hipercortisolismo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) independente, caracterizada pela presença de macronódulos adrenais funcionantes. A descoberta recente de sua relação com variantes alélicas patogênicas do gene *ARMC5*, provável gene supressor tumoral, tem indicado que esta doença seja geneticamente determinada com maior frequência do que antes se pensava. O papel dessa mutação nos parâmetros morfológicos e imuno-histoquímicos foi pouco estudado, e, portanto, esse estudo se propõe a revisitar essa doença ainda pouco conhecida a luz dessa nova descoberta. **Objetivos: 1)** Rever detalhadamente as características macro e microscópicas das glândulas adrenais ressecadas de pacientes diagnosticados com PMAH, comparando o grupo de pacientes com e sem variantes alélicas patogênicas do gene *ARMC5*; **2)** Avaliar de forma quantitativa o fenômeno de proliferação celular, índice mitótico e índice proliferativo (Ki-67) nesses espécimes, comparando os grupos com mutação (M+) e sem mutação (M-) entre si, e estes com o grupo controle; **3)** Avaliar a expressão das proteínas BCL-2, BAX, P53, SF1, ACTH, CYP11B1, CYP11B2 e da proteína relacionada ao gene *ARMC5*, comparando os grupos M+ e M- entre si, e estes com o grupo controle. **Casuística:** Foram estudados 22 espécimes cirúrgicos de pacientes adultos com PMAH, 14 do grupo M+ e 8 do grupo M-, diagnosticados na Divisão de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da FMUSP entre janeiro de 2009 e dezembro de 2017. Como grupo controle foram utilizadas 11 amostras de glândulas suprarrenais normais obtidas de pacientes submetidos à nefrectomia radical por carcinoma renal. **Métodos:** Os dados macroscópicos foram obtidos a partir da revisão dos laudos anátomo-patológicos e da documentação fotográfica disponível. A avaliação microscópica foi realizada em todas as lâminas de Hematoxilina & Eosina disponíveis de cada caso, incluindo: 4 padrões arquiteturais (Alveolar, Difuso, Trabecular e Pseudoglandular), combinados nos grupos Puro e Misto; a presença de extensão, através

da cápsula, das células adrenocorticais ao tecido adiposo adjacente; os subtipos histológicos de Hsiao; grau nuclear de Fühman, citomegalia, mitoses, adrenalite e “outros achados”. Para o estudo imuno-histoquímico foi selecionado um bloco de parafina de cada paciente, preferencialmente da glândula adrenal que foi completamente ressecada (maior espécime) e que melhor representasse a totalidade do caso. Os 11 casos-controle foram utilizados para a comparação dos índices de proliferação celular (Ki-67, avaliação quantitativa); apoptose (BCL-2, BAX, P53), expressão de SF1, ACTH e da proteína relacionada ao gene *ARMC5* (avaliação qualitativa); e esteroidogênese (CYP11B1, CYP11B2, avaliação semiquantitativa). **Resultados: Morfologia:** O padrão arquitetural pseudoglandular comportou-se como marcador da presença da mutação (M), estando presente em 14/14 casos M+ e em 0/8 casos do grupo M- ( $p < 0,001$ ); o padrão trabecular foi também mais frequente no grupo M+ (13/14 casos) do que no grupo M- (1/8 casos) ( $p < 0,001$ ); o padrão alveolar esteve igualmente presente em ambos os grupos, e o padrão difuso, foi o menos frequente, identificado somente em 5 dos 22 casos; Extensão extracapsular foi mais frequente no grupo M+ (14/14 casos) do que no grupo M- (2/8 casos ( $p < 0,001$ )). O tipo misto, com mais de 1 padrão arquitetural, ocorreu em todos os casos M+ (14/14 casos), e em metade dos casos M- (4/8 casos) ( $p < 0,001$ ); o subtipo histológico 2 de Hsiao foi o mais frequentemente observado nos casos de PMAH, nos 2 grupos, M+ e M-. **Imuno-histoquímica:** A imunoexpressão de ACTH e BCL-2 foi identificada somente na região medular e não nas células do córtex adrenal em todas as amostras de ambos os grupos M+ e M-, assim como nas glândulas controle. Em todos os casos foi observada positividade difusa das proteínas BAX e SF-1 nas células adrenocorticais, não havendo diferença entre os grupos M+, M- e entre estes e os casos controle. Os anticorpos anti-CYP11B1 e anti-CYP11B2 se mostraram bons marcadores para as camadas fasciculada e glomerulosa, respectivamente. No entanto, não foram observadas associações estatisticamente significativas entre os grupos M+ e M- para estes anticorpos. Já entre as amostras de PMAH, a imunoexpressão de CYP11B2 foi menos frequente que no grupo controle. O índice proliferativo (Ki-67) foi em geral muito baixo (<4%) não sendo observada diferença estatisticamente significante entre os grupos M+ e M-, assim como entre o grupo de adrenais portadoras de PMAH e as adrenais utilizadas como controle. Em nenhum dos casos foi observada positividade para a proteína relacionada ao gene p53. A imunoexpressão de *ARMC5* foi positiva em 6 casos de PMAH (4 M+ / 2 M-). Nos casos controle foi observada positividade citoplasmática

difusa em células adrenocorticais de todos os casos (11/11). Houve uma redução estatisticamente significativa na expressão do ARMC5 no grupo de portadores de PMAH quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). **Conclusões:** **1.** Alterações morfológicas observadas particularmente nos casos de PMAH associadas a presença de mutações do gene ARMC5, nos levam a considerar a hipótese de se tratar de uma situação biológica com comportamento intermediário entre a hiperplasia e a neoplasia. **2.** A expressão da proteína relacionada ao gene ARMC5 foi significativamente reduzida nas glândulas com PMAH em relação às glândulas normais, particularmente no grupo portador de variantes alélicas patogênicas (M+). Esse evento pode estar relacionado a perda da sua função inibitória da apoptose e conseqüente aumento do volume da glândula. **3.** O aumento desorganizado do volume da glândula adrenal na PMAH não se mostrou relacionado a aumento da proliferação celular, ou alterações nas proteínas reguladoras da apoptose, utilizando-se como parâmetros a expressão proteica de Ki-67, BCL2, BAX e P53. **4.** Imunoexpressão de ACTH foi observada **apenas** na região medular em ambos os grupos, controle e grupo de adrenais portadoras de PMAH, o que nos faz supor que, a desestruturação da relação córtico-medular na PMAH, possa ser um fator desestabilizador importante na interação funcional dessas duas regiões da glândula adrenal na PMAH, particularmente em relação ao ACTH produzido pela medular.

Descritores: Apoptose; Glândulas suprarrenais; Hiperplasia; Imuno-histoquímica; ARMC5; Genes supressores de tumor; Proliferação de células; Ciclo celular.

## Abstract

Botelho MLAA. *Primary macronodular adrenal hyperplasia: morphology, immunohistochemistry, and correlation with molecular genetic alterations* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

**Introduction:** First described in 1964, primary macronodular adrenal hyperplasia (PMAH) is a rare cause of adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-independent hypercortisolism, characterized by the presence of functioning adrenal nodules > 1.0 cm in diameter. The recent discovery that PMAH is associated with pathogenic allelic variants of *ARMC5*, a putative tumor suppressor gene, indicates that genetic determination of the disease is more common than previously thought. The role that *ARMC5* mutations play in determining the morphological and immunohistochemical characteristics of PMAH has not been widely studied. Here, we revisit PMAH in light of this discovery. **Objectives:** This study aims: to review in detail the macroscopic and microscopic characteristics of resected adrenal glands from patients diagnosed with PMAH, comparing the patients with and without pathogenic allelic variants of the *ARMC5* gene; to perform quantitative analyses of the phenomenon of cell proliferation, of the mitotic index, and of the Ki-67 proliferation index, comparing the groups with and without an *ARMC5* mutation (M+ and M-, respectively), as well as among those groups and a control group; and to evaluate the expression of the BCL-2, BAX, p53, SF1, ACTH, CYP11B1, and CYP11B2 proteins, as well as that of the protein related to the *ARMC5* gene, comparing the M+ and M- groups with each other and with the control group. **Material:** We studied 22 surgical specimens - 14 M+ group specimens and 8 M- group - obtained from adult patients diagnosed with PMAH between January 2009 and December 2017 in the “Divisão de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo”. We also studied a control group of 11 surgical samples obtained from the normal adrenal glands of patients undergoing radical nephrectomy for renal carcinoma. **Methods:** Macroscopic data were obtained by reviewing the pathology reports and photographic documentation available. Microscopic data were obtained by evaluating all the hematoxylin & eosin-stained slides available for each case, and the analysis included the following parameters: four architectural patterns (alveolar, diffuse, trabecular, and pseudo glandular); extension of adrenocortical cells,

through the capsule, to the adjacent adipose tissue; histological subtype according to Hsiao; Fühman grade; cytomegaly; mitoses; adrenalitis; and “other findings”. For the immunohistochemical study, a paraffin block was selected, preferably from an adrenal gland that had been completely resected (largest specimen), that best represented the entire case of each patient. The 11 control cases were used to compare the cell proliferation index (quantitative analysis of Ki-67); apoptosis (expression of BCL-2, BAX, and p53); expression of SF1, ACTH, and the protein related to the *ARMC5* gene (qualitative analysis); and steroidogenesis (semiquantitative analysis of CYP11B1 and CYP11B2 expression). **Results: Morphology** - The pseudo glandular architectural pattern behaved as a marker of the presence of a mutation, being observed in all 14 cases in the M+ group and in none of the 8 cases in the M- group ( $p < 0.001$ ). The trabecular pattern was also more common in the M+ group; it was observed in 13 of the 14 cases, compared with only 1 of the 8 cases in the M- group ( $p < 0.001$ ). The alveolar pattern was equally present in both groups. The diffuse pattern was the least common, being observed in only 5 of the 22 cases evaluated. Extracapsular extension was identified in all 14 of the M+ group cases, compared with only 2 of the 8 M- group cases ( $p < 0.001$ ). More than one architectural pattern was observed in all 14 M+ group cases and in 4 of the 8 M- group cases ( $p < 0.001$ ). In both groups, the most common histological subtype was Type 2 of Hsiao (diffuse hyperplasia with no residual normal or surrounding atrophic adrenal cortex). **Immunohistochemistry** - In all the specimens evaluated, including PMAH and control specimens, expression of ACTH and BCL-2 was identified only in the medullary region and not in adrenocortical cells. In all cases, diffuse positivity for BAX and SF-1 was observed in adrenocortical cells, with no statistical difference among the M+, M-, and control groups. Anti-CYP11B1 and anti-CYP11B2 antibodies proved to be useful markers of the zona fasciculata and zona glomerulosa, respectively. However, no statistically significant associations of those markers were observed with the M+ or M- groups. Expression of CYP11B2 was less common in the PMAH specimens than in the control group. The Ki-67 proliferation index was generally quite low ( $< 4\%$ ) and did not differ significantly between the M+ and M- groups or between either of those groups and the control group. None of the specimens tested positive for the p53 protein. Expression of the protein related to the *ARMC5* gene was observed in 6 of the cases of PMAH (4 M+ group cases and 2 M- group cases). Diffuse cytoplasmic positivity for that protein in adrenocortical cells was observed in all 11 control group cases. Expression of

the protein was significantly lower in both PMAH groups than in the control group ( $p < 0.001$ ). **Conclusions:** The morphological changes observed, especially in the cases of PMAH in which there were *ARMC5* gene mutations, lead us to consider the hypothesis that this is a biological situation with a behavior intermediate between that of hyperplasia and that of neoplasia. The fact that expression of the protein related to the *ARMC5* gene was significantly lower in the glands of patients with PMAH than in the normal glands, particularly in those of the patients with pathogenic allelic variants, might be related to the loss of apoptosis inhibitory effect of that protein and the consequent increase in gland volume. The disorganized increase in adrenal gland volume in PMAH was not found to be related to increased cell proliferation or changes in the expression of apoptosis regulatory proteins, such as Ki-67, BCL2, BAX, and p53. In both the PMAH groups and the control group, expression of ACTH was observed only in the medullary region. Therefore, the disruption of the corticomedullary architecture in PMAH might be an important destabilizing factor in the functional interaction between the adrenal cortex and medulla in PMAH, particularly concerning the ACTH produced by the latter.

Descriptors: Apoptosis; Adrenal glands; Hyperplasia; Immunohistochemistry; *ARMC5*; Genes, tumor suppressor; Cell proliferation; Cell cycle.

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1 A Glândula Suprarrenal

A glândula suprarrenal foi primeiramente descrita por Bartholemeus Eustachius, há cerca de 400 anos, mas sua importância vital foi somente reconhecida em 1850 quando Thomas Addison descreveu a síndrome da insuficiência adrenocortical, também conhecida como doença de Addison<sup>1</sup>.

Desde então, muitos estudos foram realizados para caracterizar sua natureza biológica e bioquímica o que levou à descoberta dos hormônios adrenocorticais e seu uso na prática clínica. A descoberta da cortisona e seu sucesso no tratamento da artrite reumatoide em 1949, por Kendall e Hench<sup>2</sup>, foi um grande impulsionador do uso clínico dos corticosteroides. No entanto, a histopatologia das glândulas suprarrenais não avançou nessa mesma velocidade sendo ainda hoje pouco compreendida, apesar dos avanços feitos com a microscopia eletrônica e mais recentemente com uso da imuno-histoquímica.

Embriologicamente, as glândulas suprarrenais são órgãos endócrinos pareados constituídos por um córtex, de origem mesodérmica e por uma medular de origem neuroectodérmica, o que as diferencia no seu desenvolvimento, estrutura e função<sup>3</sup>.

A cortical das glândulas suprarrenais tem sua esteroidogênese regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), responsável pela integração do sistema nervoso com o sistema endócrino. Dentre suas funções destacam-se:

- regulação do balanço hidroeletrolítico, produzindo mineralocorticoides (aldosterona);
- regulação dos metabolismos proteico, lipídico e de hidratos de carbono, pela secreção de glicocorticoides (cortisol);
- determinação das características sexuais secundárias, através da secreção de hormônios sexuais (androgênios).

Histologicamente, o córtex adrenal normal mede cerca de 2 mm, está localizado entre a cápsula e a medular, e pode ser dividido em três zonas (figura 1):

- zona glomerulosa: localizada na região subcapsular, é uma camada fina e geralmente descontínua, formada por grupamentos celulares arredondados. Representa cerca de 5 a 10% da cortical da adrenal e possui menos citoplasma quando comparada às células da zona fasciculada. É responsável pela secreção de mineralocorticoides.
- zona fasciculada: localizada em posição intermediária, entre a zona glomerulosa e zona reticular, representa cerca de 70% da espessura do córtex e é formada por colunas ou cordões de células com amplo citoplasma rico em lipídeos, apresentando aspecto rendilhado ou com finas vacuolizações citoplasmáticas. É responsável principalmente pela secreção de glicocorticoides (cortisol) mas também secreta hormônios sexuais.
- zona reticular: localizada em posição perimedular, geralmente mescla-se com a zona fasciculada interna e é composta por células de citoplasma compacto e eosinofílico por vezes contendo pigmento lipocrômico intracitoplasmático. É responsável pela secreção dos hormônios sexuais (androgênios).

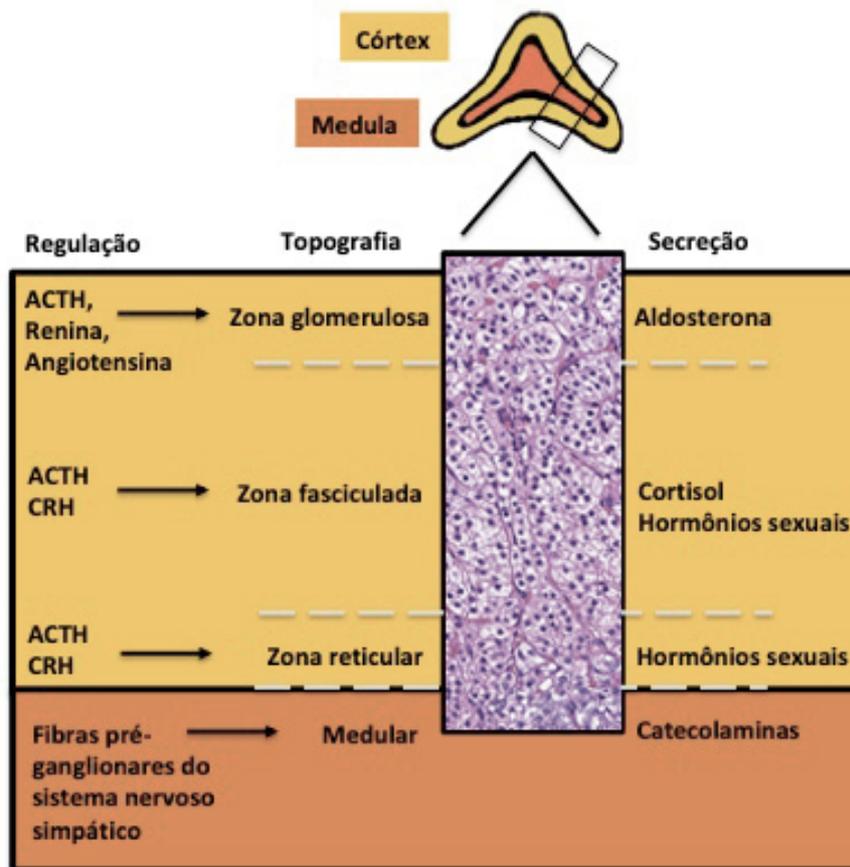


Figura 1 - Zonas do córtex e da medular da adrenal com seus respectivos hormônios secretados

Adaptado de *McGraw-Hill, 2007*<sup>4</sup>

A medular da glândula suprarrenal é composta por células cromafins distribuídas em pequenos grupamentos formando cordões anastomosantes curtos, ou em arranjo sincicial. Apresentam um amplo citoplasma anfofílico a basofílico, de bordas indistintas e um único núcleo de contornos regulares, podendo apresentar variações como cariomegalia e hiper Cromasia. São responsáveis pela síntese e secreção de catecolaminas, principalmente epinefrina/adrenalina.

A cápsula da adrenal é geralmente fina e composta por tecido fibroso hipocelular com fibras colágenas grosseiras e hialinizadas e fibras elásticas. Alguns estudos sugerem ainda, que na cápsula da adrenal estejam localizadas as células progenitoras ou células tronco somáticas, responsáveis pela renovação celular e homeostase do órgão. No

entanto, ainda não há evidências moleculares ou genéticas conclusivas que comprovem esse modelo<sup>5</sup>.

No método histoquímico de impregnação pela prata (coloração de reticulina), o córtex normal da glândula suprarrenal apresenta fibras reticulínicas de aspecto regular, todas com a mesma espessura (em “rede de pescador”), circundando totalmente as células adrenocorticais. Destaca-se assim, o arranjo cordonal das células da zona fasciculada em contraste com os pequenos grupamentos de células da zona reticular e o arranjo organoide das células cromafins, localizadas na medular da adrenal<sup>6</sup> (figura 2).

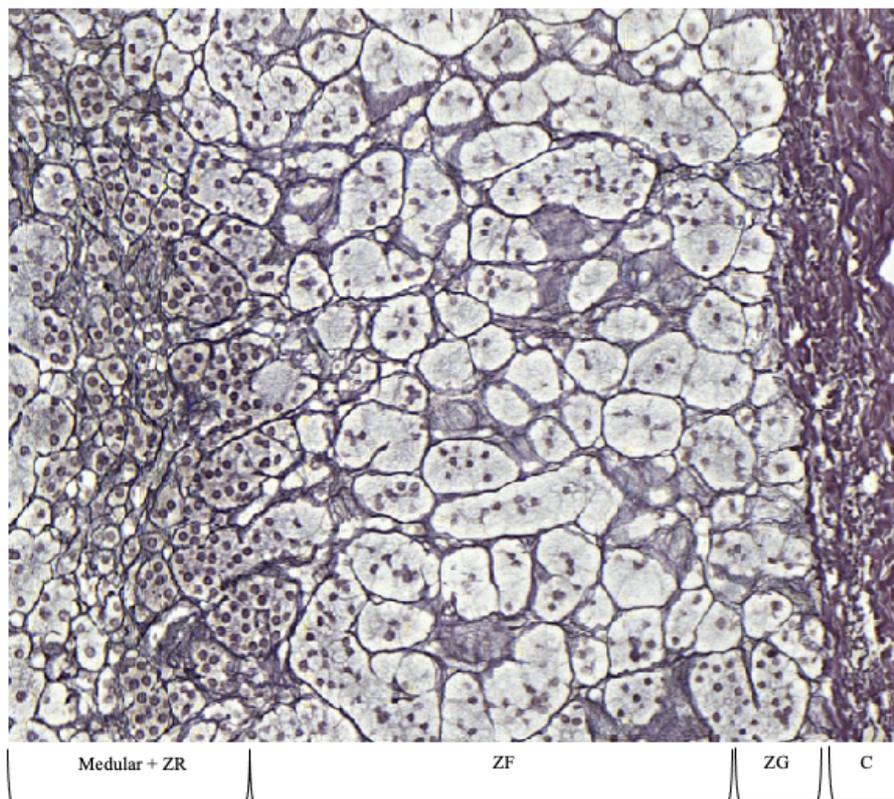


Figura 2 - Córtex adrenal na coloração histoquímica de reticulina  
ZR: zona reticular; ZF: zona fasciculada; ZG: zona glomerulosa; C: cápsula

Macroscopicamente, a glândula adrenal direita tem formato piramidal e a esquerda é mais alongada ou em meia-lua. Quando seccionadas transversalmente ao maior eixo, a glândula pode ser dividida em três partes assim designadas: terço medial ou ínfero-medial = cabeça; terço central = corpo e terço lateral ou súperolateral = cauda. A superfície côncava representa o lado ínfero-lateral da glândula (figura 3).

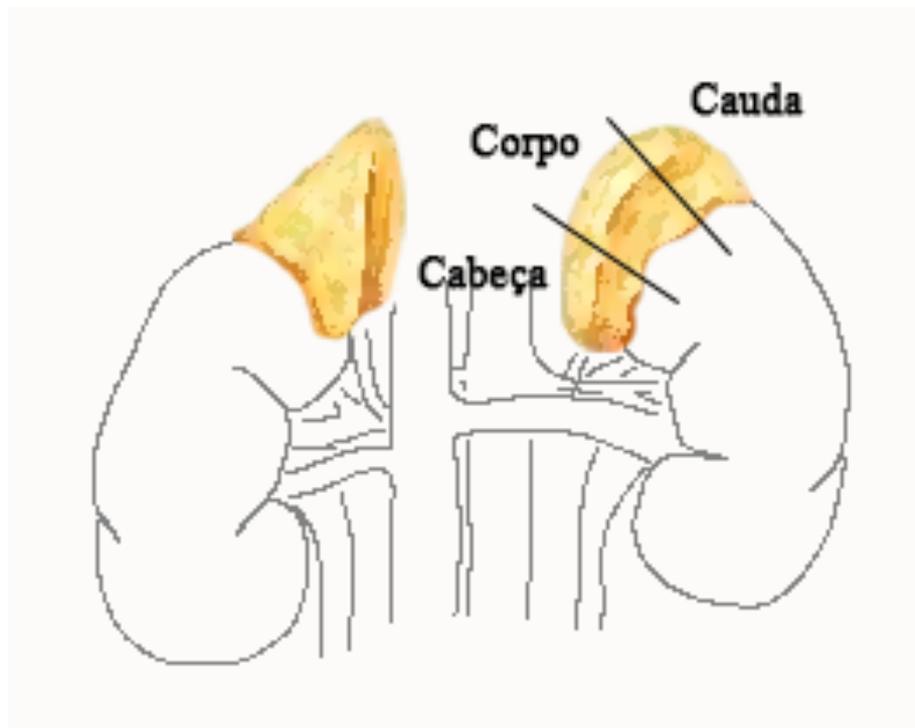


Figura 3 - Representação esquemática das glândulas adrenais e sua localização anatômica

As adrenais de indivíduos adultos pesam em média 4,0g cada uma, em material cirúrgico, e 6,0g cada, em casos de necropsia, sendo a adrenal esquerda geralmente mais pesada que a direita<sup>7</sup>. Em caso de morte súbita o peso médio das duas glândulas é geralmente maior, sendo de 9,7g para o sexo masculino e de 8,3g para o sexo feminino. De modo geral, em adultos entre 16 e 70 anos de idade o peso das glândulas é de cerca de 0,17 a 0,22g/Kg de peso corporal<sup>8</sup>.

Em 1963, Studzinski *et al.*<sup>9</sup> estudaram o efeito do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) no peso de glândulas suprarrenais e no índice mitótico, através da pesquisa e contagem de mitoses em 100 campos de grande aumento (CGA), comparando os espécimes cirúrgicos pré-administração de ACTH, pós-administração de ACTH e em casos de necrópsia. Constatou que os espécimes tratados com ACTH tinham maior peso e maior índice mitótico que os espécimes não tratados com ACTH. Concluiu assim, que o ACTH podia estar relacionado a hiperplasia da glândula suprarrenal.

## **1.2 A glândula suprarrenal em situações patológicas**

Em situações patológicas ou durante estresse, o aumento dos níveis de corticosteroides necessários para a defesa do organismo, altera a morfologia da glândula.

Macroscopicamente, estas alterações são perceptíveis pela descoloração uniforme sofrida pela glândula tornando-a pardacenta.

Ao estudo microscópico, a depleção de lípidos é a alteração mais comum. Nesta situação, as células claras ricas em lipídeos da zona fasciculada tornam-se compactas com citoplasma eosinofílico fazendo com que a zona reticular pareça maior. A extensão dessa alteração depende tanto do tempo de exposição ao estresse como de sua intensidade. Uma outra alteração microscópica descrita é a degeneração tubular caracterizada pela conversão dos cordões celulares sólidos em estruturas tubulares revestidas por células achatadas e que podem conter material proteináceo ou células degeneradas.

É importante ressaltar também que praticamente todos os espécimes cirúrgicos ou de necrópsias de pacientes adultos apresentam algum grau de nodularidade no parênquima. Postula-se que alterações isquêmicas localizadas, causadas por idade, aterosclerose, hipertensão e/ou diabetes mellitus levem a degeneração e atrofia de

grupamentos celulares e a uma hipertrofia compensatória de grupamentos celulares adjacentes, formando assim nódulos, que variam em tamanho e número de acordo com a gravidade dos eventos acima descritos<sup>1</sup>. Dessa forma, este achado não está necessariamente relacionado a doenças do córtex da adrenal.

### **1.3 Hipercortisolismo e síndrome de Cushing (SC)**

As síndromes hiper adrenais são classificadas de acordo com o hormônio secretado em excesso e, portanto, podem ser divididas em três grupos:

- Hipercortisolismo (SC): caracterizada por excesso de cortisol;
- Hiperaldosteronismo: causada pelo excesso de aldosterona;
- Síndromes androgênicas ou virilizantes: causadas pelo excesso de esteroides sexuais.

O hipercortisolismo é causado por qualquer condição que produza níveis elevados de cortisol. Pode ser exógeno (iatrogênico), causa mais frequente, ou endógeno. O hipercortisolismo endógeno é também sub-classificado como ACTH-dependente e ACTH-independente (tabela 1).

Tabela 1 - Causas endógenas de síndrome de Cushing (adaptado de *Newell-Price J et al., 2006*<sup>10</sup>)

<b>Causas endógenas de síndrome de Cushing</b>	<b>Frequência relativa (%)</b>
<b>Dependente de ACTH</b>	
Adenoma de hipófise	70%
Síndrome da corticotrofina ectópica	10%
<b>Independente de ACTH</b>	
Adenoma adrenocortical	10%
Carcinoma adrenocortical	5%
<b>PMAH</b>	<b>&lt;2%</b>
Doença adrenocortical nodular pigmentar primária	<2%
Síndrome de McCune-Albright	<2%

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

\*PMAH: do inglês, *Primary macronodular adrenal hyperplasia*

Entre as causas de hipercortisolismo ACTH-dependente destacam-se os adenomas hipofisários secretores de ACTH, responsáveis por cerca de 70% dos casos e a síndrome da corticotrofina ectópica, que pode ocorrer em alguns carcinomas secretores de ACTH, como o carcinoma neuroendócrino de pequenas células do pulmão, que corresponde a cerca de 10% dos casos. Entre as causas de hipercortisolismo endógeno ACTH-independente, estão os adenomas adrenocorticais (cerca de 10%), os carcinomas adrenocorticais (cerca de 5%) e menos frequentemente a doença adrenocortical nodular pigmentar primária (<2%), a síndrome de McCune-Albright (<2%) e a hiperplasia adrenocortical macronodular primária (cerca de 2% dos casos), objetivo principal deste estudo<sup>3, 11</sup>.

Clinicamente, a Síndrome de Cushing (hipercortisolismo) caracteriza-se por apresentar obesidade centrípeta, pletora facial, miopatia proximal, estrias violáceas e vermelhas e atrofia da pele (tabela 2). Alguns pacientes, no entanto, podem apresentar

níveis séricos elevados de cortisol, sem o desenvolvimento dos sinais e sintomas clínicos típicos da SC, sendo classificados como hipercortisolismo sub-clínico (HS).

Tabela 2 - Características clínicas da síndrome de Cushing (adaptado de *Newell-Price J et al.*<sup>10</sup>)

<b>Características clínicas da síndrome de Cushing</b>	
Obesidade ou ganho de peso	95%
Pletora facial	90%
Face arredondada	90%
Libido diminuída	90%
Pele fina e frágil / estrias cutâneas	85%
Irregularidade menstrual	80%
Hipertensão	75%
Hirsutismo	75%
Depressão	70%
Intolerância à glicose	60%
Fraqueza	60%
Osteopenia	50%

Diante de um paciente com quadro clínico sugestivo de SC, a confirmação do hipercortisolismo e sua etiologia dependem de exames laboratoriais complementares e de exames de imagem.

Para a confirmação do hipercortisolismo são utilizados ao menos dois testes funcionais que enfoquem diferentes aspectos da fisiologia do eixo HHA. Os mais utilizados são: medida da concentração de cortisol livre na urina de 24 horas; dosagem do cortisol sérico livre no plasma após administração de 1mg dexametasona (teste de supressão com dexametasona); e dosagem do cortisol salivar à meia-noite<sup>12</sup>.

Confirmado o hipercortisolismo prossegue-se investigação para determinação se este é dependente ou independente de ACTH, e sua etiologia. Para tanto utilizam-se duas dosagens de ACTH plasmático com intervalo de 15 minutos. Os valores normais de ACTH estão entre 10-50pg/mL às 9h. Concentrações indetectáveis ou na faixa inferior da normalidade (<5pg/mL) confirmam hipercortisolismo independente de ACTH, incluindo tumores adrenais, PMAH ou hiperplasia micronodular. Ao contrário, se as concentrações de ACTH estiverem elevadas, como na doença de Cushing ou na síndrome de ACTH ectópico, confirma-se que o hipercortisolismo é dependente de ACTH (figura 4).

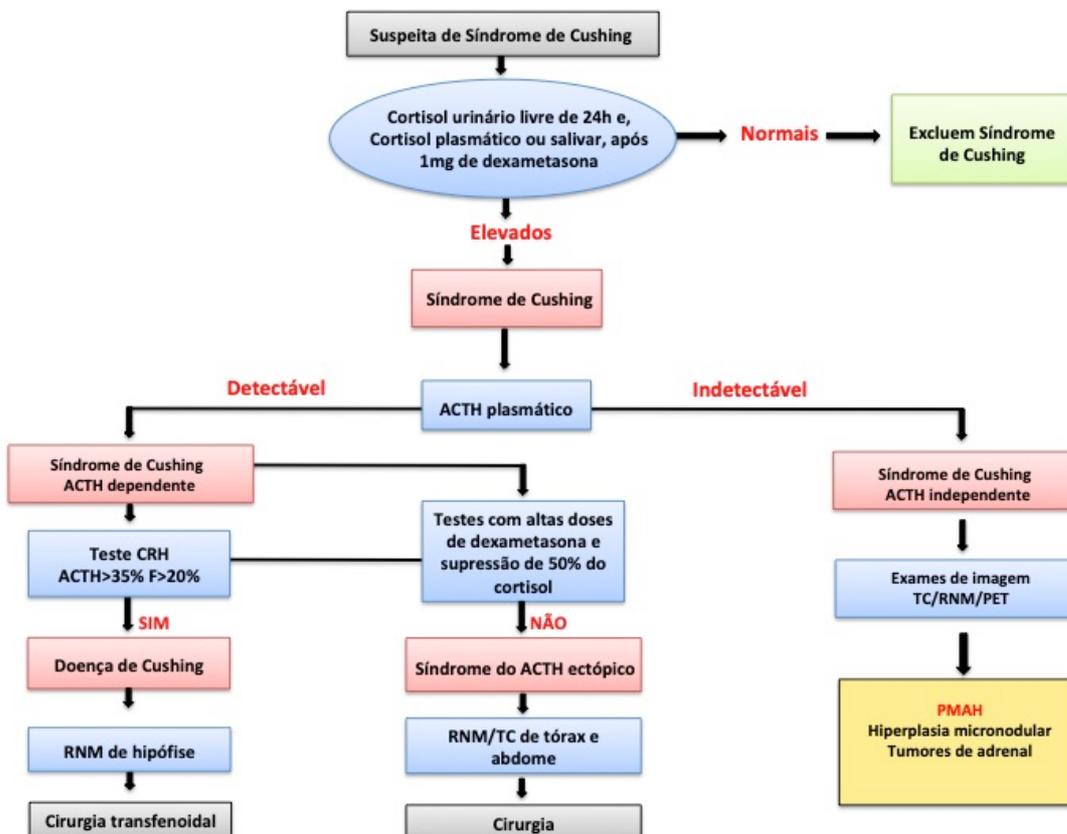


Figura 4 - Algoritmo para o diagnóstico clínico de hipercortisolismo (adaptado de Saad AJM et al.<sup>12</sup>)

#### 1.4 A hiperplasia adrenocortical macronodular primária (PMAH)

Descrita em 1964 por Kirschner *et al.*<sup>13</sup>, a hiperplasia adrenocortical macronodular primária (PMAH) é uma causa rara de hipercortisolismo ACTH-independente, caracterizada pela presença de macronódulos adrenais funcionantes<sup>14-16</sup>. Embora seja mais frequente em adultos, raros casos pediátricos já foram publicados<sup>17, 18</sup>. Na maioria das vezes, o que se observa é um quadro clínico parcial, denominado hipercortisolismo subclínico (HS), embora alguns pacientes apresentem o fenótipo clássico da SC.

Em sua descrição original, as glândulas suprarrenais apresentavam-se muito aumentadas bilateralmente, pesando 50g à direita e 44g à esquerda e com arquitetura distorcida pela presença de múltiplos nódulos. A cápsula era adelgada, mas aparentemente intacta. A superfície de corte apresentava numerosos nódulos medindo de 0,2 a 3,5 cm e a medular era visível e comprimida entre os nódulos na região central da glândula. Microscopicamente, os nódulos eram numerosos e os menores localizados principalmente nas camadas fasciculada e reticular, enquanto os maiores acometiam toda a espessura do córtex, sem extensão extra adrenal. Embora bem delimitados os nódulos não apresentavam cápsula. Não foi observado invasão angiolinfática, invasão capsular, necrose, atipias nucleares significantes e/ou necrose. As células dos nódulos, que se assemelhavam às células da zona fasciculada, eram grandes e poligonais com membranas bem delimitadas e citoplasma vacuolizado rico em lipídeos. Em alguns nódulos maiores observavam-se traves e cordões de células pequenas com citoplasma eosinofílico e granular de permeio<sup>13</sup>.

Posteriormente, novas publicações<sup>14, 19, 20</sup> descreveram que na PMAH cada glândula exibia diversos nódulos medindo cerca de 1cm de diâmetro podendo chegar a

5cm ou mais e que cada adrenal podia atingir de 10 a 12 cm podendo pesar até 200g. Foram descritos também, por Hsiao *et al.* (2009)<sup>14</sup>, dois padrões morfológicos de distribuição dos nódulos:

- Tipo 1: múltiplos nódulos com tecido cortical atrófico de permeio.
- Tipo 2: hiperplasia difusa da glândula adrenal.

Porém, não houve correlação do padrão histopatológico com receptores expressos ou qualquer outra característica clínica.

#### **1.4.1 Quais os critérios diagnósticos para essa entidade?**

A PMAH parece ocorrer com igual prevalência nos dois sexos e na maioria das vezes, torna-se clinicamente manifesta por volta da 5ª a 6ª década de vida. Até recentemente acreditava-se que a SC clássica fosse a primeira forma de apresentação clínica da PMAH. No entanto, atualmente propõe-se que o HS seja a forma mais frequente e, portanto, subdiagnosticada.

É importante salientar que a história natural da doença ainda não é bem compreendida e não se sabe se todos os pacientes evoluiriam para a SC clássica ao longo dos anos.

Nas fases iniciais da PMAH os sintomas e sinais decorrentes do hipercortisolismo podem ser discretos ou mesmo ausentes, e, portanto, o diagnóstico precoce está fundamentado nos exames laboratoriais e de imagem.

Devido ao quadro clínico pouco evidente, o diagnóstico da PMAH é geralmente um achado incidental em exames de imagem durante investigação de Síndrome de Cushing (tardia) ou, retrospectivamente em famílias com casos descritos de PMAH.

Recentemente foi demonstrado que o teste de supressão com 1mg de dexametasona, VO, à meia noite é o teste laboratorial de escolha para o diagnóstico precoce da PMAH. Utilizando-se como critério da normalidade o valor do cortisol sérico  $\leq 50\text{nmol/L}$  ( $\leq 1,8\text{mcg/dL}$ ) esse teste apresentou uma sensibilidade de 90% e uma especificidade de 87,3% para o diagnóstico de PMAH em sua fase inicial<sup>21</sup>.

Para o diagnóstico radiológico e confirmação do aumento bilateral associado a presença de nódulos nas glândulas suprarrenais, podem ser realizados exames de tomografia computadorizada (TC), de ressonância nuclear magnética (RNM) e de tomografia por emissão de pósitrons com fluordesoxiglicose marcada, acoplada à TC ( $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT)<sup>22</sup>.

Na RNM observam-se sequências ponderadas em T1, hipointensas em relação ao fígado e isointensas em relação ao músculo nas adrenais hiperplásicas. Nas sequências ponderadas em T2, as adrenais da PMAH, mostram-se hiperintensas em relação ao fígado, diferentemente da imagem da adrenal da doença de Cushing ACTH-dependente, que se mostra isointensa. Na sequência fora de fase (*chemical-shift*) é observada uma perda do sinal nas imagens, o que é compatível com um teor maior de lípidos intracelulares<sup>23</sup>.

O  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT, é usualmente utilizado na diferenciação das lesões adrenais malignas e benignas, já que permite a avaliação conjunta da anatomia com a atividade metabólica da glândula (figura 5). A alta captação da fluordesoxiglicose marcada ( $^{18}\text{F}$ -FDG) nas adrenais da PMAH, é semelhante ao apresentado pelos carcinomas e metástases adrenais: valor padrão de captação máxima (SUVmax)  $>3,1$ ; atividade aumentada da  $^{18}\text{F}$ -FDG na adrenal em relação ao fígado; e uma relação SUVmax da lesão adrenal/SUVmax hepática  $\geq 1,8$ <sup>24, 25</sup>.

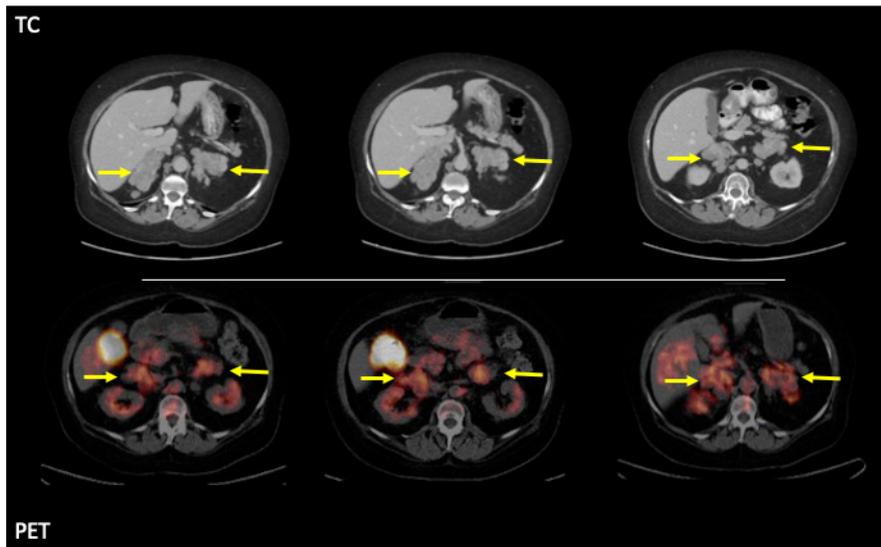


Figura 5: TC e  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT (caso 11)

*Adrenais de dimensões aumentadas e contornos lobulados à custa de múltiplas formações nodulares, a maior à esquerda com 7,5 cm no seu maior diâmetro (setas). PET: aumento da atividade glicolítica (setas)*

#### 1.4.2 Fisiopatologia da PMAH: o que se conhece no momento e quais as questões relevantes a serem respondidas?

Apesar dos avanços e das descobertas feitas desde a descrição da PMAH em 1964, sua fisiopatologia ainda não foi elucidada de forma completa. Dentre os mecanismos propostos destacam-se:

- Regulação anormal do córtex adrenal por receptores hormonais aberrantes;
- Mutação ativadora do gene do receptor do ACTH (*MC2R*);
- Mutação ativadora do gene da subunidade alfa da proteína Gs (*GNAS*);
- Variantes alélicas do gene da fosfodiesterase 11A (*PDE11A*);
- Produção intra-adrenal de ACTH
- Mutação inativadora do gene *Armadillo Repeat Containing Protein 5* (*ARMC5*);
- Associação da PMAH a síndromes genéticas.

#### ***1.4.2.1 Regulação anormal do córtex adrenal por receptores hormonais aberrantes***

Um dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos e descritos na PMAH, é a produção de cortisol regulada por receptores hormonais aberrantes. Diferentes hormônios circulantes (GIP, epinefrina, norepinefrina, hormônio luteinizante, gonadotrofina coriônica humana, serotonina e vasopressina), se ligariam aos receptores aberrantes acoplados à proteína G, determinando a ativação da via de sinalização mediada pela adenilato ciclase (AC), adenosina 3',5' monofosfato cíclico (AMPc) e proteína cinase A (PKA). A ativação dessa via levaria à fosforilação de uma série de fatores de transcrição (TF) e expressão de enzimas esteroidogênicas, levando a síntese inapropriada de cortisol e hiperplasia das adrenais (figura 6). No entanto, o mecanismo pelo qual esses receptores são superexpressos nos tecidos adrenocorticais ainda é desconhecido<sup>26, 27</sup>.

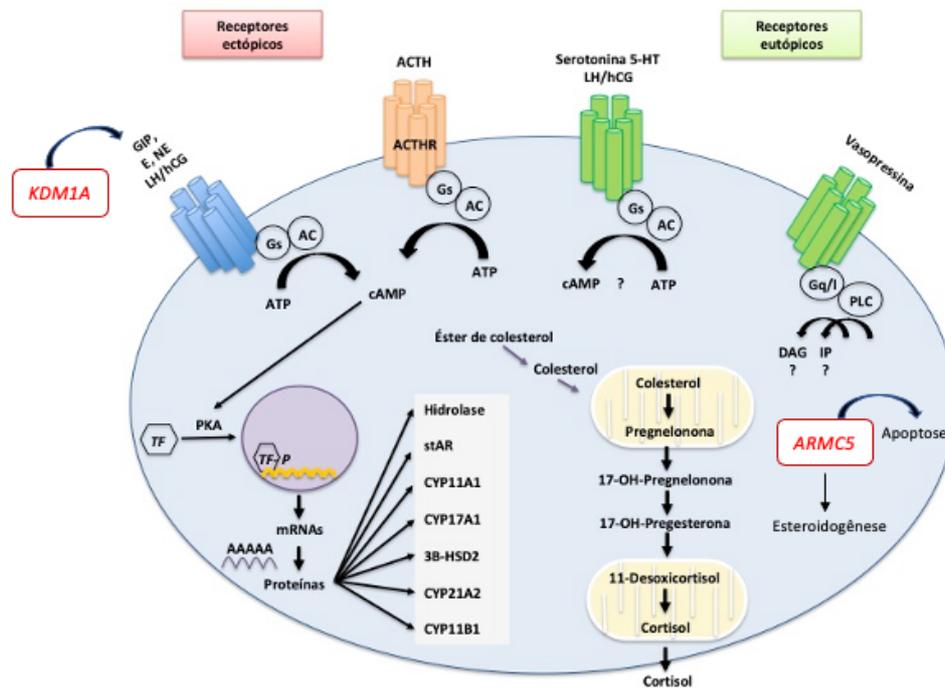


Figura 6 - Regulação anormal do córtex adrenal mediada por receptores hormonais aberrantes

GIP - peptídeo inibitório gástrico; E - epinefrina; NE - norepinefrina; serotonina 5-hidroxitriptamina - serotonina 5-HT; LH - hormônio luteinizante; hCG - gonadotrofina coriônica humana; AC - adenilato ciclase; AMPc - Adenosina 3'5'-Monofosfato cíclico; PKA - proteína quinase A; ACTHR- receptor do ACTH; V1R - receptor V1 da vasopressina; PLC - fosfolipase C; DAG - diacilglicerol; IP3 - inositol trifosfato; StAR - proteína reguladora aguda da esteroidogênese; CYP11A1 - colesterol desmolase; CYP17A1 - 17alfa-hidroxilase/17,20-liase; 3B-HSD2 - 3beta-hidroxiesteroide desidrogenase do tipo 2; CYP21A2 - 21-hidroxilase; CYP11B1 - 11B-hidroxilase; TF - fatores de transcrição

Fonte: Adaptado de Lacroix *et al.*<sup>27</sup> e Charchar *et al.*<sup>28</sup>

#### 1.4.2.2 Mutação ativadora do gene do receptor do ACTH (MC2R)

O receptor do ACTH melanocortina-2 (MC2R) está acoplado à proteína G presente nas células da zona fasciculada da adrenal e sua expressão é regulada pelas proteínas MRAP e MRAP2. Quando o ACTH se liga ao MC2R há ativação da via da adenilato-ciclase (AC), via subunidade Alfa da proteína Gs, que consequentemente, induz ativação da PKA e leva ao aumento do cortisol. A mutação germinativa ativadora do gene receptor *MC2R* é considerada uma causa extremamente rara da PMAH, sendo descrita em um único caso<sup>29</sup>.

#### **1.4.2.3 *Mutação ativadora do gene da subunidade alfa da proteína Gs (GNAS)***

Mutações somáticas ativadoras do gene *GNAS*, que codificam a subunidade alfa da proteína Gs, determinam ativação constitutiva da via de sinalização da AC/AMPC/PKA, levando à síndrome de McCune-Albright. Embora infrequentes, essas mutações já foram descritas na PMAH, na ausência das demais manifestações clínicas da síndrome (manchas café com leite, displasia óssea fibrosa poliostótica e puberdade precoce periférica de origem ovariana). No entanto, a real importância dessas mutações na fisiopatologia da PMAH ainda precisa ser mais bem definida.<sup>30-32</sup>

#### **1.4.2.4 *Variantes alélicas do gene da fosfodiesterase 11A (PDE11A)***

Mutações no gene *PDE11A* estão relacionadas na etiologia genética da doença adrenal nodular pigmentada e foram recentemente descritas na PMAH. No entanto, também foram observadas em populações controle e, portanto, podem ser consideradas polimorfismos<sup>33</sup>. Dessa forma não é possível estabelecer a relação causal entre a mutação do gene *PDE11A* e PMAH até o presente momento.

#### **1.4.2.5 *Produção intra-adrenal de ACTH***

Recentemente, também foi demonstrado que embora esta doença seja independente de ACTH ela não é inteiramente autônoma, pois foi constatada a secreção ectópica de cortisol por grupamentos de células da cortical da adrenal<sup>26</sup>.

Assim, o ACTH produzido pela adrenal hiperplásica poderia regular de forma autócrina e/ou parácrina, a secreção de cortisol pela glândula. Embora acredite-se que esse mecanismo não seja a alteração primária responsável pela hiperplasia da suprarrenal, mas sim um evento secundário, a comprovação dessa relação com o ACTH poderia levar

a redefinição da doença como uma causa de hipercortisolismo ACTH-dependente ou ainda, hipercortisolismo ACTH hipofisário independente.

#### 1.4.2.6 *Mutação inativadora do gene ARMC5*

A PMAH pode ser esporádica, ou determinada geneticamente por herança autossômica dominante com penetrância incompleta. Embora a forma esporádica fosse considerada a mais comum, estudos recentes envolvendo a descoberta do gene *ARMC5* (figura 7), tem indicado que a PMAH pode ser mais frequentemente geneticamente determinada do que antes se pensava. Estudos recentes mostram que a mutação germinativa no gene *ARMC5* está presente em cerca de 50% dos pacientes considerados esporádicos<sup>34, 35</sup>. Entretanto, tanto a função do gene *ARMC5*, como seus mecanismos de inativação no desenvolvimento da PMAH continuam pouco conhecidos<sup>36</sup>.

Alguns trabalhos sugerem que esse gene atue como um supressor tumoral<sup>34, 35</sup>, mas os mecanismos fisiopatológicos ainda não são completamente conhecidos.

Recentemente, Cavalcante *et al.*<sup>37</sup> estudaram o papel do gene *ARMC5* em cultura de células extraídas de espécimes cirúrgicos de adrenais com diagnóstico de PMAH, com e sem a mutação do gene *ARMC5*, alguns dos quais, fazem parte deste estudo (casos 2, 10, 11, 13, 15 e 18). A partir de células em cultura de pacientes M+ ou com o gene silenciado, observaram uma diminuição na expressão dos mRNA de *stAR*, *CYP11A1*, *CYP17A1*, *NR5A1*, *SF1* e *MC2R*, confirmando a importância do *ARMC5* na esteroidogênese da PMAH. De maneira análoga observaram que a superexpressão do *ARMC5* levou a um aumento dos parâmetros esteroidogênicos e de *MC2R* mRNA, tanto nas células do grupo M+, como nas do grupo M-, reforçando a associação do *ARMC5* com a esteroidogênese. Estudaram também a superexpressão do *ARMC5* na apoptose e necrose, concluindo que o *ARMC5* é uma proteína pró-apoptótica.

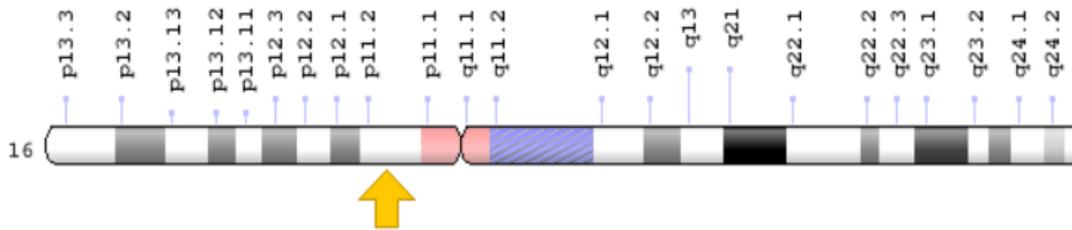


Figura 7 - O gene *ARMC5*

O gene *ARMC5* está localizado no braço curto do cromossomo 16 na posição 11.2 (seta). Extraído de *Genome decoration page/NCBI*.

Mais recentemente, Vaczlavik *et al.* (2022),<sup>38</sup> identificaram variantes alélicas patogênicas no gene *KDM1A*, sobretudo em pacientes com PMAH e SC associadas à alimentação. A inativação deste gene levaria a expressão ectópica de receptores do Peptídeo inibitório gástrico (GIP) e consequente aumento da produção de cortisol (figura 6). Chasseloup *et al.* (2021)<sup>39</sup>, também demonstraram a superexpressão de GIP em pacientes com PMAH que apresentavam mutações inativadoras no gene *KDM1A*. Em nenhum destes casos foram observadas variantes alélicas patogênicas relacionadas ao gene *ARMC5*, o que sugere que se trate de eventos moleculares mutuamente exclusivos<sup>28</sup>.

#### 1.4.2.7 Associação da PMAH a síndromes genéticas

A PMAH foi identificada em associação com síndromes genéticas como a neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (NEM 1), polipose adenomatosa familiar, leiomiomatose hereditária com carcinoma renal e síndrome de McCune-Albright<sup>28</sup>. No entanto, nenhuma mutação relacionada aos genes relacionados à NEM1, polipose adenomatosa familiar (gene *APC*, cromossomo 5q22) e leiomiomatose hereditária com carcinoma renal (Fumarato Hidratase; OMIM 136850, 1q43), foram identificadas nos casos de PMAH fora do contexto destas síndromes<sup>40, 41</sup>.

### **1.4.3 Porque a glândula se torna hiperplásica na PMAH? – o papel da proliferação e de apoptose**

De forma geral, os tecidos adultos podem sofrer adaptações celulares baseadas em: (1) alterações de crescimento celular, podendo diminuir sua complexidade biológica em resposta à uma situação de precariedade (atrofia/hipotrofia) ou, aumentando sua capacidade estrutural e funcional (hipertrofia); e (2) alterações de proliferação e de diferenciação celular, nas quais a adaptação ocorre por aumento no número de células (hiperplasia), mudança no seu programa de diferenciação (metaplasia) ou ambos (displasia)<sup>42</sup>.

Embora a hiperplasia e a hipertrofia sejam processos distintos, frequentemente ocorrem simultaneamente e em proporções difíceis de serem mensuradas. As causas também são basicamente as mesmas (aumento da demanda funcional, compensação, desregulação endócrina, inflamação e hiper estimulação) e estão relacionadas a uma maior disponibilidade local de fatores de crescimento e hormônios, que induzem a proliferação celular. A morte celular (apoptose) também induz a hiperplasia, sobretudo nos tecidos que tem alto potencial regenerativo intrínseco, como o fígado, por exemplo.

A apoptose é uma via de morte celular programada, regulada pela ativação de enzimas que degradam seu próprio DNA e suas proteínas nucleares e citoplasmáticas, permitindo assim a rápida fagocitose desses fragmentos/corpos apoptóticos, não desencadeando, assim, uma resposta inflamatória no hospedeiro. É um fenômeno que ocorre tanto em situações fisiológicas por exemplo, durante a embriogênese e a organogênese, como em situações patológicas, quando a apoptose ocorre em células que são lesadas de modo irreparável (lesão de DNA, acúmulo de proteínas anormalmente dobradas e em infecções)<sup>3</sup>.

Os mecanismos de apoptose ocorrem por duas vias principais:

- 1) Via intrínseca ou mitocondrial: é ativada por numerosos fatores incluindo subtração de fatores de crescimento, lesão de DNA por toxinas ou radiação, e proteínas mal dobradas que alteram o retículo endoplasmático. Essa ativação leva então, à liberação de proteínas pró-apoptóticas (BAX e BAK) e ao bloqueio de proteínas anti-apoptóticas (BCL-2 e BCL-X), ambas pertencentes à família BCL-2, criando canais na membrana mitocondrial e permitindo a liberação de proteínas mitocondriais (citocromo *c*) que ativam a via das caspases pela enzima desencadeante caspase-9.
- 2) Via extrínseca: é ativada por proteínas pró-apoptóticas como o citocromo *c* (via intrínseca) e por receptores de morte celular da família do fator de necrose tumoral (TNF), localizados na membrana citoplasmática e ligados à proteína Fas. A ativação desses receptores e consequentemente da proteína Fas, com seu ligante (FasL) forma o domínio de morte FADD (*Fas-associated death domain*) que se liga às caspases 8 e 10, ativando as vias das caspases.

Ambas as fases descritas, portanto, convergem para a via de ativação das caspases que modulam a fase final de apoptose. A ativação das caspases desencadeantes 9 (via intrínseca) e 8 e 10 (via extrínseca), levam à ativação das caspases executoras 3 e 6, que levam a clivagem do DNA e degradam os componentes da matriz nuclear, fragmentando o núcleo<sup>3</sup>.

Na PMAH as glândulas suprarrenais apresentam-se muito aumentadas de tamanho e com numerosos macronódulos, no entanto, até hoje sua fisiopatologia não é bem compreendida.

Dentre os mecanismos propostos anteriormente, destaca-se a possível ação pró-apoptótica e esteroidogênica do gene *ARMC5*, que procuraremos avaliar nesse estudo.

#### 1.4.4 Esteroidogênese: o papel das enzimas CYP11B1, CYP11B2 e do fator de transcrição SF1

A figura 8 ilustra de forma sintética a síntese de aldosterona e cortisol pelas camadas glomerulosa e fasciculada do córtex adrenal, respectivamente. A enzima CYP11B1 está envolvida na transformação de 11-deoxicortisol em cortisol na via final da esteroidogênese, sendo utilizada recentemente como um marcador das células envolvidas na secreção de cortisol e conseqüentemente da zona fasciculada. A enzima CYP11B2 participa na síntese de aldosterona transformando desoxicorticosterona em corticosterona e corticosterona em aldosterona. Dessa forma a CYP11B2 também tem sido utilizada como um marcador da síntese de aldosterona e da camada glomerulosa.

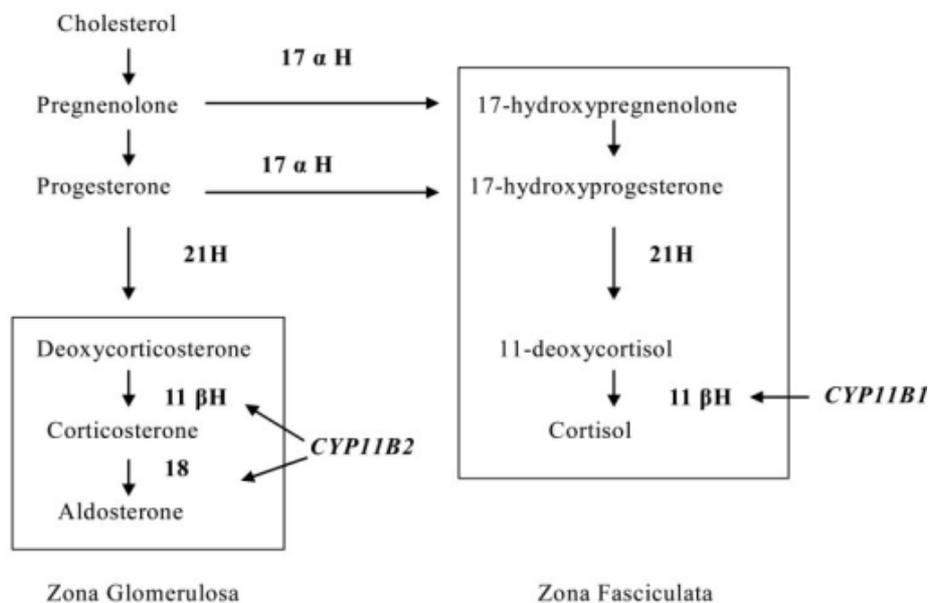


Figura 8 - Síntese de aldosterona e cortisol. *Extraído de Freel EM and Connell JM, 2004*<sup>43</sup>

Já a proteína fator 1 esteroideogênica (SF1), é um fator de transcrição envolvido na determinação do sexo, controlando a atividade de genes relacionados aos órgãos esteroideogênicos como as adrenais e as gônadas, testículos e ovários. Ele desempenha um importante papel no desenvolvimento desses órgãos<sup>44, 45</sup>, na regulação da biossíntese de esteroides<sup>46, 47</sup>, assim como aumentam a proliferação das células adrenocorticais *in vitro* e a tumorigênese em camundongos<sup>48-50</sup>. Recentemente, a utilização do anticorpo anti-SF1 passou a ser de grande utilidade no diagnóstico diferencial entre as neoplasias adrenocorticais primárias e as metástases.

## 1.5 Tratamento

Segundo a literatura, o tratamento cirúrgico de escolha para os pacientes diagnosticados com PMAH e que apresentam síndrome de Cushing clássica é a adrenalectomia total bilateral<sup>51</sup>. No entanto, na tentativa de evitar a insuficiência adrenal definitiva, novos tratamentos cirúrgicos têm sido propostos e estudados com resultados promissores, dentre os quais, destacam-se a adrenalectomia unilateral da maior glândula<sup>52-54</sup>, associada ou não, à adrenalectomia parcial da glândula contralateral. A adrenalectomia total da maior glândula associada a adrenalectomia parcial da glândula contralateral tem sido o tratamento de escolha para os pacientes diagnosticados no HCFMUSP com PMAH, e que possuem indicação de tratamento cirúrgico<sup>55, 56</sup>.

Em pacientes com PMAH que apresentam um quadro de HS ou que são assintomáticos, não há consenso na literatura sobre o melhor tratamento<sup>57</sup> e a decisão do tratamento cirúrgico é feita caso a caso.

## **2. OBJETIVOS**

---

- 1) Rever detalhadamente as características macro e microscópicas das glândulas adrenais ressecadas de pacientes diagnosticados com PMAH, comparando o grupo de pacientes com e sem variantes alélicas patogênicas do gene *ARMC5*;
- 2) Avaliar de forma quantitativa o fenômeno de proliferação celular, índice mitótico e índice proliferativo (Ki-67) nesses espécimes, comparando o grupo de pacientes com e sem variantes alélicas patogênicas do gene *ARMC5* entre si, e estes com o grupo controle;
- 3) Avaliar a expressão das proteínas BCL-2, BAX, P53, SF1, ACTH, CYP11B1, CYP11B2, e da proteína relacionada ao gene *ARMC5*, comparando os grupos de pacientes com e sem variantes alélicas patogênicas do gene *ARMC5*, entre si, e estes com o grupo controle.

### **3. METODOLOGIA**

---

### 3.1 Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAPPesq número 15747) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Sob o ponto de vista ético, este estudo confere risco mínimo, caracterizado pela quebra eventual de sigilo dos dados do paciente. Entretanto, os pesquisadores se comprometem a não divulgar esses dados e a manter total sigilo.

### 3.2 Casuística

Nesse estudo foram avaliados 22 pacientes diagnosticados com PMAH na Divisão de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da FMUSP entre janeiro de 2009 e dezembro de 2017, dos quais 14 foram identificados como portadores de variantes alélicas patogênicas do gene *ARMC5*. Nos outros 8 pacientes não foram identificadas alterações genéticas. Estudamos também 11 casos-controle (glândulas suprarrenais normais) obtidos de pacientes submetidos à nefrectomia radical por carcinoma renal, que foram utilizados para a comparação dos índices de proliferação celular (Ki-67), apoptose (BCL-2, BAX, P53) e expressão de SF1, ACTH, CYP11B1, CYP11B2 e da proteína relacionada ao gene *ARMC5*.

O diagnóstico de PMAH foi concluído através de investigação clínica, radiológica, laboratorial e de exame anátomo-patológico dos espécimes cirúrgicos correspondentes a ressecção da ou das glândulas doentes, realizados respectivamente na Disciplina de Endocrinologia e Metabologia e na Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da FMUSP. As lâminas e blocos de parafina foram obtidos nos arquivos da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da FMUSP. Todos os pacientes são ou foram tratados e acompanhados na Unidade de Suprarrenal e no

Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42 da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

### **3.3 Avaliação clínica**

Os dados clínicos foram obtidos, respectivamente, a partir da revisão dos prontuários do Hospital das Clínicas da FMUSP. Os dados clínicos dos pacientes incluíram as seguintes variáveis: idade ao diagnóstico, gênero, parentesco, presença de meningioma, características clínicas relacionadas ao hipercortisolismo, presença de variantes alélicas patogênicas do gene *ARMC5* e tratamento.

### **3.4 Avaliação morfológica**

#### **3.4.1 Avaliação macroscópica**

Os dados macroscópicos foram obtidos a partir da revisão dos laudos de macroscopia e da documentação fotográfica e de mapeamento disponíveis segundo protocolo sugerido (quadro 1).

Quadro 1 - Protocolo anátomo-patológico - Macroscopia

CASO:				
NOME:				
RGHC:				
<b>MACROSCOPIA</b>				
Integridade do espécime	ÍNTEGRO	SECCIONADO	FRAGMENTADO	
Peso (g)				
Medida (cm)				
Lateralidade	DIREITA	ESQUERDA		
Superfície de corte				
Presença de nódulos	SIM	MÚLTIPLOS	ÚNICO	NÃO
Diâmetro do maior nódulo				

### 3.4.2 Avaliação microscópica

A avaliação microscópica foi realizada em todas as lâminas de Hematoxilina & Eosina disponíveis de cada caso e anotadas de acordo com o protocolo sugerido (quadro 2).

Quadro 2 - Protocolo anátomo-patológico – Microscopia

CASO:				
NOME:				
RGHC:				
<b>MICROSCOPIA</b>				
<b>Características dos nódulos</b>				
<b>Distribuição dos nódulos (Hsiao, 2009)<sup>14</sup></b>	<b>TIPO 1</b>		<b>TIPO 2</b>	
<b>Parênquima adrenal normal remanescente</b>	<b>SIM</b>		<b>NÃO</b>	
<b>Porcentagem de células claras (%)</b>				
<b>Porcentagem de células compactas (%)</b>				
<b>Relação células compactas/células claras</b>				
<b>Padrão de distribuição das células*</b>	<b>ALVEOLAR</b>	<b>TRABECULAR</b>	<b>PSEUDOGLANDULAR</b>	<b>DIFUSO</b>
<b>Extensão extracapsular</b>	<b>FOCAL</b>		<b>MULTIFOCAL</b>	<b>AUSENTE</b>
<b>Características citológicas</b>				
<b>Adrenalite</b>	<b>INTENSO</b>		<b>MODERADO</b>	<b>DISCRETO</b> <b>AUSENTE</b>
<b>Citomegalia</b>	<b>SIM</b>		<b>NAO</b>	
<b>Mitoses</b>	<b>SIM</b>		<b>No. mitoses/50CGA</b>	<b>NÃO</b>
<b>Grau de Fühman</b>	<b>1</b>		<b>2</b>	<b>3</b> <b>4</b>
<b>Necrose</b>	<b>SIM</b>		<b>%</b>	<b>NÃO</b>
<b>Outros achados</b>	<b>METAPLASIA MIELOIDE</b>		<b>METAPLASIA ADIPOSA</b>	<b>OUTROS</b>

\*PADRÃO ALVEOLAR: células adrenocorticais dispostas em alvéolos circundados por finos septos conjuntivo vasculares. PADRÃO TRABECULAR: células adrenocorticais dispostas em colunas paralelas, separadas por finos septos conjuntivo vasculares; PADRÃO PSEUDOGLANDULAR: células adrenocorticais dispostas formando estruturas glandulares com lúmen central; PADRÃO DIFUSO: sem padrão arquitetural definido (*patternless*); CGA: campo de grande aumento

### 3.5 Exame imuno-histoquímico

Para o estudo imuno-histoquímico foi selecionado um bloco de cada paciente, preferencialmente da glândula adrenal que foi completamente ressecada (maior espécime) e que melhor representasse a totalidade do caso.

Cortes dos espécimes cirúrgicos de cada glândula suprarrenal selecionada foram colocados em lâminas silanizadas (*Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, EUA*).

1. Desparafinização dos cortes de 3 $\mu$  de espessura, do material incluído em parafina: incubação com xilol a 60° C por 20 minutos seguido de outra incubação com xilol à temperatura ambiente por 20 minutos.
2. Hidratação dos cortes em concentrações de etanol a 100% com 3 banhos de 30 segundos cada, etanol a 95%, 80% e 70% por 30 segundos, lavagem em água corrente e água destilada.
3. Recuperação antigênica mediante incubação das lâminas em solução tampão Tris-EDTA, pH 9.0 (PMB4-125) *Spring Bioscience*, com exceção do marcador SF1, para o qual foi utilizada a recuperação em alta temperatura com EDTA- PH 8, em panela a vapor. Deixar esfriar por 20 minutos à temperatura ambiente. Lavagens em água corrente e água destilada.
4. Bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 6% diluída v/v em metanol, em três banhos de 10 minutos cada. Lavagens em água corrente e água destilada. Lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos.
5. Bloqueio de proteínas com *Cas Block™ (Invitrogen by Life Technologies)* cat. n° 00-8120 por 10 minutos a 37°C. Escorrer e incubar com o anticorpo primário.
6. Incubação das lâminas com anticorpo primário (específico para o antígeno) diluído em solução de albumina bovina (BSA) (*SIGMA, EUA*) a 1,0% e azida sódica NaN<sub>3</sub>

- (Inlab, São Paulo) 0,1% em PBS, em câmara úmida: 30 min. a 37°C e, em seguida, 18 horas (overnight) a 4°C. Lavagens em tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada.
7. Incubação com o bloqueador pós-primário (*Post Primary Block, NovoLink Max Polymer Detection System, Leica Biosystems, Newcastle Ltd*), Ref. RE7 159, por 30 minutos a 37°C. Lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada.
  8. Incubação com NovoLink (*Polimer, Leica Biosystems, Newcastle Ltd*), Ref. RE7 161, para os anticorpos anti-CYP11B1 e anti-CYP11B2 e incubação com o anticorpo secundário/sistema de amplificação *Reveal - Biotin-Free Polyvalent DAB (SPRING)*, para os demais anticorpos, por 30 minutos em estufa 37°C. Lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada.
  9. Revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (*Sigma, EUA*) a 0,10%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfoxido (*Labsynth*) a 1% em PBS, em banho de 5 minutos, a 37°C. Lavagens em água corrente e água destilada.
  10. Contra-coloração com hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavagens em água corrente e água destilada. Imersão rápida em água amoniacal (sol. de hidróxido de amônia 0,5%) seguido de lavagens em água corrente e água destilada.
  11. Desidratação dos cortes em banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol absoluto (3 trocas de 1 minuto cada), diafanização em banhos de xilol (3 trocas de 1 minuto cada) e montagem em meio permanente (*Entellan, Merck, cod. 1.07961.0100*) com lamínula.

Os controles utilizados na reação imuno-histoquímica compreendem, um controle positivo sabidamente positivo para o anticorpo em estudo e um controle negativo com

incubação em PBS e eliminação do anticorpo primário, sendo efetuados todos os demais procedimentos imuno-histoquímicos.

As informações sobre os anticorpos primários utilizados são apresentadas no quadro 3.

Quadro 3 - Informações técnicas sobre os anticorpos primários utilizados

Anticorpo Anti	Diluição	Recuperação	Marca	Clone	Código	Compartimento Celular
ARMC5	1:50	EDTA pH 9	Novus	Policlonal	NBP1-94024	C
P53	Flex*	EDTA pH 9	DAKO, Denmark, EUA	DO-7	IS616	N
BAX	1:250	EDTA pH 9	Santa Cruz Biotechnology	B-9	sc7480	C
BCL2	1:100	EDTA pH 9	DAKO, Denmark, EUA	124	M0887	C
Ki-67	1:400	EDTA pH 9	DAKO, Denmark, EUA	MIB1	M7240	N
ACTH	1:100	EDTA pH 9	DAKO, Denmark, EUA	02A3	M3501	C
SF1	1:100	EDTA pH 8	Invitrogen	Rabbit-policlonal	434200	N
CYP11B1	1:100	EDTA pH 9	Millipore	80-7	MABS502	C
CYP11B2	1:400	EDTA pH 9	Millipore	41-17B	MABS1251	C

\*Flex: anticorpo primário já adquirido pré-diluído; N: núcleo; C: citoplasma

### 3.5.1 Análise imuno-histoquímica

As lâminas imunocoradas com o anticorpo anti-Ki67 foram digitalizadas em um *Scanner* de lâminas histológicas (*Zeiss Laser Scanning, Germany*) utilizando-se o *software Pannoramic Viewer 1:15* (3DHISTECH, Hungary). As imagens em alta resolução obtidas e utilizadas para a análise morfométrica **quantitativa** foram processadas pelo *software* de código aberto QuPath versão 3.1 (<https://qupath.github.io/>). Um mínimo de 1000 células foi analisado através do algoritmo de detecção de células

(*cell detection*), seguido pelo algoritmo de detecção de células positivas (*positive cell detection*). Os resultados foram apresentados em porcentagem de núcleos positivos.<sup>58, 59</sup>

A mensuração dos anticorpos anti-CYP11B1 e anti-CYP11B2 foi feita avaliando-se, de forma **semiquantitativa**, a porcentagem de imunexpressão e dividindo-se em 4 categorias: Categoria 0: ausência de expressão; Categoria 1: imunexpressão em 1 a 5% das células; Categoria 2: imunexpressão em 6 a 25% das células; Categoria 3: imunexpressão em 26 a 50% das células; Categoria 4: imunexpressão em 51 a 75% das células; Categoria 5: imunexpressão em mais de 75% das células.

A avaliação dos anticorpos P53, SF-1, BCL-2, BAX, ARMC5 e ACTH foi feita de forma **qualitativa** observando a presença ou ausência de imunexpressão, na zona cortical, incluindo as camadas glomerulosa, fasciculada e reticular e na medular da adrenal.

### 3.6 Análise estatística

A aderência das variáveis quantitativas à distribuição normal foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. As médias das variáveis quantitativas foram comparadas através do teste t de *Student* para amostras independentes ou pelo teste de Mann-Whitney (não paramétrico, para as variáveis que não apresentaram distribuição normal). O teste exato de Fisher foi empregado para avaliação da associação entre variáveis categóricas.

O ponto de corte para a variável razão entre células claras e células compactas foi estabelecido com base no percentil 25 da distribuição dos valores (percentil 25=1,5), sendo criadas duas categorias:  $<1,5$  e  $\geq 1,5$ .

Para todos os testes estatísticos foi adotado um erro alfa=5%, isto é, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas com o auxílio do *software Stata* versão 15.1.

## 4. RESULTADOS

---

#### 4.1 Achados clínicos e demográficos

As características clínicas e demográficas encontram-se na tabela 6 e são resumidas no texto abaixo.

Ao diagnóstico, 21/22 apresentavam hipertensão arterial sistêmica (HAS), 15/22 apresentavam síndrome de Cushing, 5/22 hipercortisolismo subclínico e em 2/22 o achado foi incidental. Três pacientes tinham meningioma (3/22). A maioria dos pacientes era do sexo feminino (17/22).

Foram identificadas variantes alélicas patogênicas em 14 dos 22 casos (grupo M+) dos quais 8 possuem algum grau de parentesco (4 famílias diferentes). No grupo denominado M- (8/22) não foram identificadas variantes alélicas patogênicas. Esses dados foram apresentados detalhadamente em publicações anteriores do grupo<sup>34</sup>.

Quatorze pacientes foram tratados com adrenalectomia total + parcial contralateral; sete fizeram adrenalectomia total unilateral e em somente um foi feita adrenalectomia parcial unilateral (antecedente de adrenalectomia total contralateral). Dentre os espécimes da adrenalectomia total, seis foram à direita e 16 à esquerda.

Quadro 4 - Características clínicas e demográficas

	Sexo	Idade (anos)	Mutação	Tipo mutação	Parentesco	Quadro clínico ao diagnóstico	HAS	Meningioma	TTO
1	F	58	Sim	GF+SE	Parente do 7	SC	Sim	Sim	ATD
2	F	47	Sim	GE	-	SC	Sim	Não	ATD+APE
3	F	57	Não	-	-	Incidental	Sim	N/A	ATE+APD
4	M	41	Sim	GF+SE	Filho do 19	HS	Sim	Não	ATD+APE
5	F	50	Sim	GE+SE	-	SC	Sim	N/A	ATE
6	M	68	Não	-	-	HS	Sim	Não	ATE+APD
7	M	61	Sim	GF+SE	Parente do 1	HS	Sim	N/A	ATD+APE
8	F	61	Não	-	-	HS	Sim	Não	ATE+APD
9	F	51	Não	-	-	HS	Sim	N/A	ATE
10	F	63	Sim	GE	-	SC	Sim	Sim	ATE+APD
11	F	56	Sim	GE	-	SC	Sim	N/A	ATD
12	F	50	Não	-	-	SC	Sim	Não	ATE
13	F	45	Sim	GF+SE	Irmã do 21	SC	Sim	Não	ATE+APD
14	M	52	Sim	GF	-	SC	Sim	Não	ATE+APD
15	M	45	Sim	GF+SE	Irmão do 20	SC	Sim	Não	ATE+APD
16	F	50	Não	-	-	SC	Sim	Não	APD
17	F	69	Não	-	-	SC	Sim	Não	ATD+APE
18	F	68	Sim	GF+SE	Mãe do 4	SC	Sim	Sim	ATE+APD
19	F	54	Sim	GF+SE	Irmã do 16	SC	Sim	N/A	ATE
20	F	45	Sim	GF+SE	Irmã do 14	SC	Sim	Não	ATE+APD
21	F	41	Sim	GF	-	SC	Sim	Não	ATE+APD
22	F	64	Não	-	-	Incidental	N/A	N/A	ATE

ATD - adrenalectomia total direita; ATE - adrenalectomia total esquerda; APD - adrenalectomia parcial direita; APE - adrenalectomia parcial esquerda; GF - germinativa familiar; GE - germinativa esporádica; SE - somática esporádica; SC - síndrome de Cushing; HS - hipercortisolismo subclínico; HAS - hipertensão arterial sistêmica; N/A - não avaliável; TTO - tratamento

Em relação ao *status* mutacional (tabela 12) não foram observadas associações estatisticamente significativas entre a presença de mutação e as variáveis sexo ( $p=0,613$ ), presença de meningioma ( $p=0,505$ ), HAS ( $p=0,364$ ), tipo de cirurgia realizada ( $p=0,386$ ) e lateralidade ( $p=0,351$ ).

A média de idade dos pacientes ao diagnóstico foi de 54,4 anos, variando entre 41 e 69 anos. Entre os pacientes do grupo M+ a média de idade foi menor (51,86 anos) que no grupo M- (58,75 anos), porém não houve significância estatística ( $p=0,075$ ).

#### **4.2 Achados macroscópicos**

Os resultados da revisão dos achados macroscópicos são apresentados no quadro 5, sendo resumidos no texto abaixo.

Para o cálculo do peso médio das glândulas adrenais, consideramos o peso do maior espécime ressecado (produto de adrenalectomia total) presente no laudo anátomo-patológico. Em alguns laudos encontramos o peso do espécime total e o peso da glândula adrenal após remoção do tecido adiposo, sendo considerado este último. Em dois casos não foi possível identificação do peso: em um porque o espécime não foi pesado e no outro porque os espécimes cirúrgicos dos lados direito e esquerdo foram enviados no mesmo frasco e pesados em conjunto. O caso 17 foi o único caso de adrenalectomia parcial unilateral à direita (paciente com antecedente de adrenalectomia total esquerda em outro serviço) e, portanto, não consideramos seu peso para cálculo da média.

Assim, o peso médio das 19 glândulas adrenais totalmente ressecadas foi de 79,3g variando de 17,3 a 200g. Nos pacientes do grupo M+, embora a média do peso tenha sido maior (84,73g) que no grupo M- (48,10g), não houve significância estatística ( $p=0,22$ ).

Para comparação do tamanho dos espécimes cirúrgicos utilizamos o volume glândulas adrenais totalmente ressecadas (produto de adrenalectomia total) a partir das medidas documentadas no laudo anátomo-patológico. Assim como no peso, em alguns laudos encontramos as medidas do espécime total e a medida da glândula adrenal após remoção do tecido adiposo, sendo considerado esta última. Em um caso não foi possível identificação da medida pois o espécime cirúrgico foi enviado fragmentado em três

frascos distintos e medidos individualmente. O caso 17 também não foi considerado para o cálculo do volume.

Assim, dos 20 casos avaliados a medida no maior eixo variava de 4,5 cm a 15 cm e o volume de 33,3 a 420 cm<sup>3</sup>. Nos pacientes do grupo M+, embora a média do volume tenha sido maior (220,91g) que no grupo M- (107,18g), não houve significância estatística (p=0,069).

Quadro 5 - Achados macroscópicos

<b>Caso</b>	<b>Lateralidade do maior espécime ressecado</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Tamanho (cm)</b>	<b>Volume (cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Diâmetro do maior nódulo - cm)</b>
1	Direita	38,0	6,5 x 7,5 x 2,7	131,6	1,8
2	Direita	39,1	6,0 x 2,8 x 2,5	42	1,5
3	Esquerda	54,8	10,0 x 5,0 x 3,5	175	7,5
4	Direita	74,2	10,0 x 6,0 x 4,0	240	N/A
5	Esquerda	52,2	10,0 x 6,0 x 1,5	90	N/A
6	Esquerda	46,6	9,8 x 6,9 x 2,4	162,3	2,1
7	Direita	30,8	9,0 x 4,0 x 1,5	54	5,0
8	Esquerda	90,3	9,0 x 5,0 x 3,5	157,5	5,5
9	Esquerda	17,3	4,5 x 3,7 x 2,0	33,3	3,5
10	Esquerda	158,9	14,0 x 7,0 x 4,0	392	2,0
11	Direita	190,0	15,0 x 6,5 x 3,8	370,5	3,0
12	Esquerda	N/A	N/A	N/A	1,7
13	Esquerda	65,8	14,7 x 5,4 x 3,7	293,7	1,1
14	Esquerda	65,0	14,0 x 7,8 x 2,8	305,8	3,7
15	Esquerda	200,0	14,0 x 7,5 x 4,0	420	N/A
16	Direita	18,0	6,0 x 3,5 x 2,0	42	3,5
17	Direita	31,5	11,0 x 4,0 x 1,8	79,2	N/A
18	Esquerda	70,2	10,6 x 6,0 x 2,5	159	N/A
19	Esquerda	90,0	11,0 x 6,0 x 3,0	198	1,8
20	Esquerda	23,1	6,5 x 3,5 x 2,0	45,5	6,0
21	Esquerda	88,9	12,5 x 5,5 x 5,1	350,6	N/A
22	Esquerda	N/A	6,2 x 3,4 x 1,7	35,8	0,7

N/A: não avaliável

Aos cortes as glândulas adrenais apresentavam múltiplos nódulos difusamente distribuídos medindo entre 0,7 e 7,5 cm (figura 9).

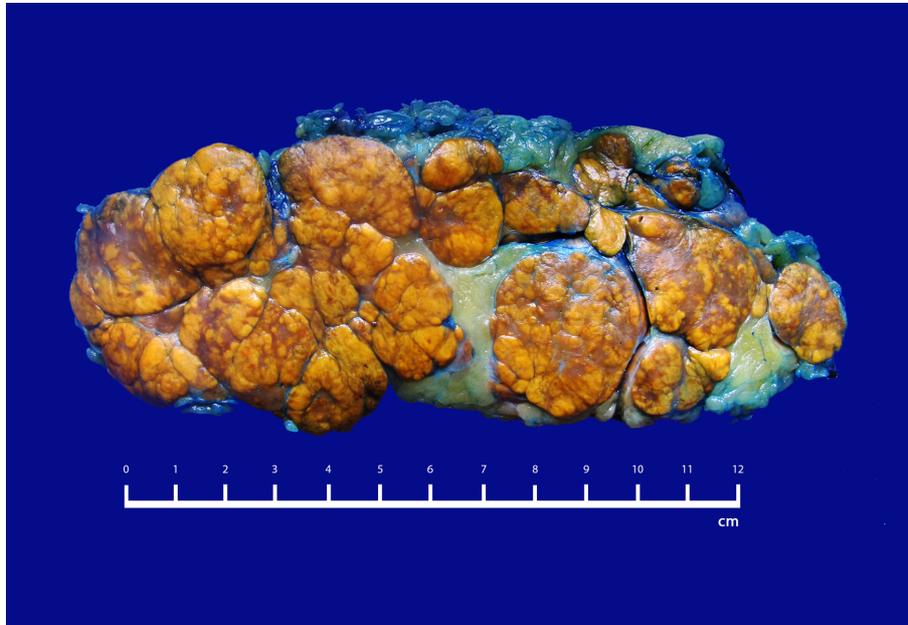


Figura 9 - Superfície de corte de produto de adrenalectomia direita do caso 11 (grupo M+) mostrando parênquima da glândula adrenal aumentado de volume e totalmente distorcido por múltiplos macronódulos confluentes de padrão e coloração heterogêneos. Não se observa parênquima adrenal normal remanescente

#### 4.3 Achados microscópicos

Os resultados dos achados microscópicos são apresentados no quadro 6, sendo resumidos no texto a seguir.

A análise microscópica de todas as lâminas coradas pela hematoxilina & eosina (H&E) disponíveis de cada caso revelou a presença de nódulos não encapsulados e constituídos em sua maior parte por uma mistura de células com amplo citoplasma claro, denominadas células claras, e de células citoplasma eosinofílico e relativamente menores, denominadas células compactas. A proporção entre células claras e células compactas foi estimada visualmente lâmina a lâmina. O ponto de corte para a variável razão entre

células claras e células compactas foi estabelecido com base no percentil 25 da distribuição dos valores (percentil 25=1,5), sendo criadas duas categorias: <1,5 e ≥1,5.

Quadro 6 - Achados microscópicos

Casos	Tipos* (Hsiao <sup>14</sup> )	Cél. clara / Cél. compacta	Padrão arquitetural	EEC	Fürhmann	Citomegalia	Mitoses	Adrenalite	Outros achados
1	2	80/20	A/T/P	Sim	4	Sim	Não	Discreta	MA
2	2	70/30	A/T/P	Sim	2	Não	Sim	Discreta	MA MTO HA
3	1	90/10	A	Não	1	Não	Não	Discreta	MA
4	1	90/10	A/T/P	Sim	2	Não	Sim	Discreta	MA
5	1	80/20	A/T/P	Sim	2	Não	Não	Discreta	MA
6	2	40/60	A/D	Não	4	Sim	Não	Discreta	MA Pigmento
7	1	70/30	A/P	Sim	3	Não	Não	Discreta	MA Calcificação
8	1	90/10	A/T	Sim	2	Sim	Sim	Discreta	MA NO Calcificação
9	1	80/20	A	Não	2	Não	Não	Intensa	MA
10	2	90/10	A/T/P	Sim	2	Não	Não	Discreta	MA
11	2	70/30	A/T/P	Sim	2	Não	Não	Discreta	MA
12	N/A	10/90	A/D	Não	2	Não	Não	Moderada	MA MTO MM Pigmento
13	2	90/10	A/T/P	Sim	1	Não	Não	Discreta	MA
14	1	80/20	A/T/P	Sim	2	Não	Não	Discreta	MA
15	2	90/10	A/T/P	Sim	2	Não	Não	Discreta	MA
16	2	60/40	A	Não	4	Sim	Sim	Intensa	NO Calcificação Pigmento
17	2	90/10	A	Sim	1	Não	Não	Discreta	MM Pigmento
18	1	60/40	A/T/P/D	Sim	4	Sim	Não	Moderada	MA Mucina Pigmento
19	2	60/40	A/T/P	Sim	2	Não	Não	Discreta	MA NO
20	2	50/50	A/T/P	Sim	2	Não	Não	Discreta	MA
21	2	80/20	A/T/P	Sim	4	Sim	Não	Ausente	Ausente
22	2	50/50	A/D	Não	1	Não	Não	Discreta	Mielolipoma

EEC - extensão extracapsular. Padrões citoarquiteturais: A - alveolar, T - trabecular, P - pseudoglandular, D - difuso. Outros achados: MA - metaplasia adiposa, MTO – metaplasia tecal-ovariana, MM - metaplasia mioide, HA - hemorragia antiga, NO - nódulo oncocítico

O padrão de distribuição das células também foi analisado em todas as lâminas de H&E disponíveis de cada caso e foram considerados presentes mesmo que identificados focalmente. Foram identificados quatro padrões morfológicos citoarquiteturais assim denominados: alveolar, pseudoglandular, trabecular e difuso (*patternless* ou sem padrão) (figura 10). Os casos foram classificados como puros, quando somente um padrão estava presente, ou misto, quando uma mistura de dois ou mais padrões em qualquer proporção estava presente.

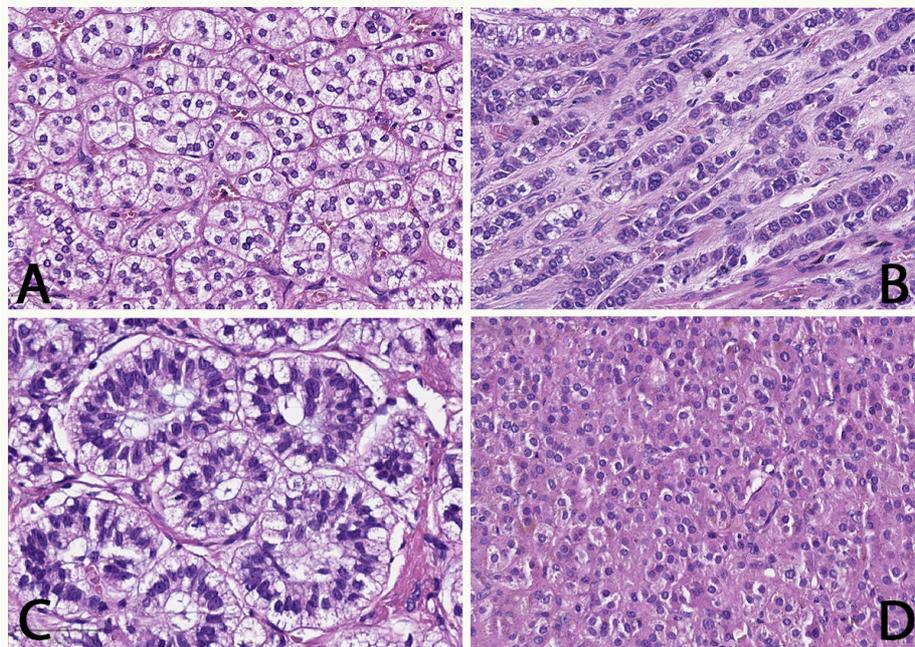


Figura 10 - Padrões morfológicos citoarquiteturais

A – alveolar; B – trabecular; C – pseudoglandular; D – difuso

O padrão alveolar foi o mais frequente, sendo observado em todos os casos estudados, além de ser o único padrão identificado de forma pura, em 4/22 casos. Os demais padrões foram observados de forma mista, sendo o padrão trabecular identificado em 14 casos, o padrão pseudoglandular em 14 casos e o padrão difuso, menos frequente, em somente 5 dos 22 casos estudados. Foram observadas associações estatisticamente significativas entre a presença de mutação e o tipo de padrão observado (puro ou misto) ( $p=0,010$ ) e a presença de padrão pseudoglandular (presente ou ausente) ( $p<0,001$ ) ou

trabecular (presente ou ausente) ( $p < 0,001$ ). A frequência de mutação foi significativamente maior nos pacientes que apresentavam padrão misto (77,8% comparado a 0% nos pacientes que apresentaram padrão puro) e naqueles que apresentaram padrão pseudoglandular (mutação=100%) ou trabecular (mutação=92,9%).

Em relação aos tipos 1 e 2 descritos por Hsiao *et al.*<sup>14</sup> procuramos reproduzir essa subclassificação e encontramos um padrão predominante do tipo 2 (13 de 22) em comparação com o tipo 1 (8 de 22). Em uma amostra, a classificação não foi possível porque o espécime estava fragmentado. Comparando o grupo M+ com o M-, o tipo 2 também foi mais frequente no grupo M+ (9 de 14) do que no grupo M- (5 de 8). Comparando o grupo M+ com o M-, o tipo 2 também foi mais frequente no grupo M+ (9 de 14) do que no grupo M- (5 de 8). Em ambos os casos, os resultados não foram estatisticamente significativos.

A presença de extensão extracapsular (figura 11), de maneira focal ou multifocal, foi um achado frequente, estando ausente em apenas 6 dos 22 espécimes estudados. Nos espécimes que apresentavam o padrão trabecular ou pseudoglandular de distribuição das células, a presença de extensão extracapsular foi mais frequentemente identificada (tabela 3).

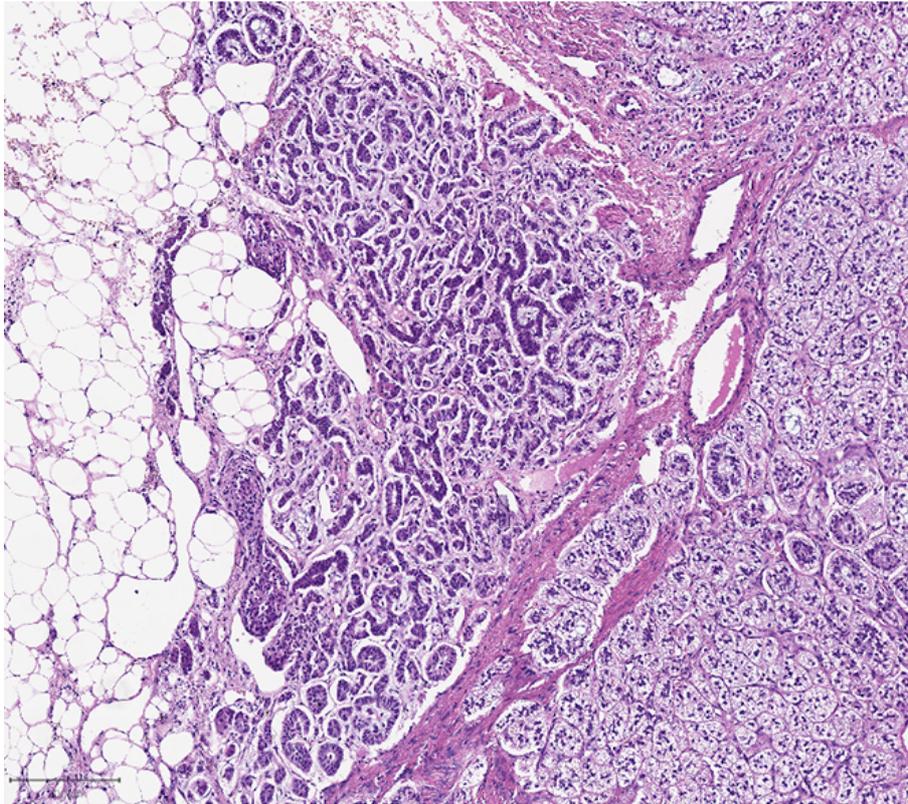


Figura 11 - Área de extensão extracapsular, destacando-se os padrões morfológicos trabecular e pseudoglandular (Caso 1, M+)

Tabela 3 - Associação entre extensão extracapsular e padrão único ou misto

Variável	Categoria	Extensão extracapsular (%)		p*
		Não	Sim	
Padrão	Misto	3 (16,7)	15 (83,3)	<b>0,046</b>
	Único	3 (75,0)	1 (25,0)	

\*Nível de significância estatística segundo o teste exato de Fisher.

Também foi observada associação estatisticamente significativa entre a presença de extensão extracapsular e a frequência de mutação, sendo esta maior no grupo de pacientes com extensão extracapsular (81,3%) ( $p < 0,001$ ) (tabela 4).

Tabela 4 - Associação entre extensão extracapsular e padrão morfológico citoarquitetural

Variável	Categoria	Extensão extracapsular N (%)		p*
		Não	Sim	
Padrão	Misto	3 (16,7)	15 (83,3)	<b>0,046</b>
	Único	3 (75,0)	1 (25,0)	
Padrão pseudoglandular	Não	6 (75,0)	2 (25,0)	<b>&lt;0,001</b>
	Sim	0 (0,0)	14 (100,0)	
Padrão trabecular	Não	6 (75,0)	2 (25,0)	<b>&lt;0,001</b>
	Sim	0 (0,0)	14 (100,0)	
Padrão difuso	Não	3 (50,0)	14 (87,5)	0,100
	Sim	3 (50,0)	2 (12,5)	

\*Nível de significância estatística segundo o teste exato de Fisher

Adrenalite, caracterizada pela presença de pequenos focos de infiltrado inflamatório constituído por linfócitos e plasmócitos, foi identificada em todos os espécimes sendo discreta em 17 casos, moderada em dois casos, intensa em dois casos e ausente em apenas 1 caso (Figura 12). Para estudo estatístico os casos de adrenalite ausente e discreta foram agrupadas em um grupo e os casos de adrenalite moderada e intensa em outro grupo.

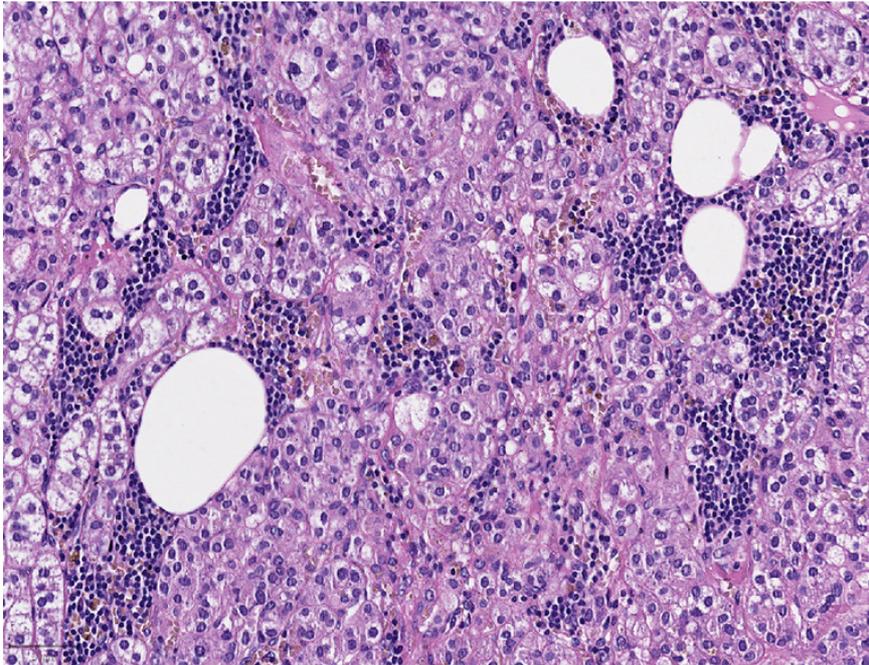


Figura 12 - Adrenalite. Infiltrado inflamatório crônico discreto em meio a focos de metaplasia adiposa (Caso 2, M+)

Do ponto de vista citológico foi utilizado o grau de Fürhman de 1 a 4<sup>60</sup> para graduar as características nucleares, sempre graduando-se pelo maior grau presente, mesmo que focalmente:

grau 1: núcleo redondo, uniforme, com nucléolo inconspícuo ou ausente

grau 2: núcleo discretamente irregular com nucléolo evidente

grau 3: núcleo bastante irregular com nucléolo proeminente

grau 4: núcleo bizarro e multilobulado com nucléolo proeminente e cromatina condensada.

Dos 22 casos, 4 casos foram Grau 1, 12 casos grau 2, 1 caso grau 3 e 4 casos grau 4 de Fürhman. Para estudo estatístico os graus 1 e 2 foram agrupadas em um grupo e os graus 3 e 4 em outro grupo.

A pesquisa de mitoses foi realizada em 50 campos de grande aumento (CGA), sendo um evento raro, identificado somente em 4 dos 22 casos estudados. Não foram identificadas mitoses atípicas em nenhum dos casos estudados.

Não foram observadas associações estatisticamente significativas entre a presença de mutação e as variáveis adrenalite ( $p=0,117$ ), grau de Fühman ( $p=1,000$ ), citomegalia ( $p=0,624$ ), presença de metaplasia adiposa ( $p=0,117$ ), presença de mitoses ( $p=0,602$ ), tipo histológico 1 e 2 ( $p=1,000$ ) e razão células claras/células compactas ( $p=0,117$ ).

Dentre outras características morfológicas destacamos a metaplasia adiposa (figura 13) presente em todos os casos avaliados, metaplasia mieloide (figura 14) em um caso, mielolipoma (figura 15) em um caso, calcificações em 4 casos (figura 16), hemorragia antiga, pigmento, células eosinofílicas (figura 17), mucina em 1 caso cada (figura 18) e dois casos de metaplasia tecal ovariana (figura 19)<sup>61</sup>. Em nenhum dos casos foi observado necrose.

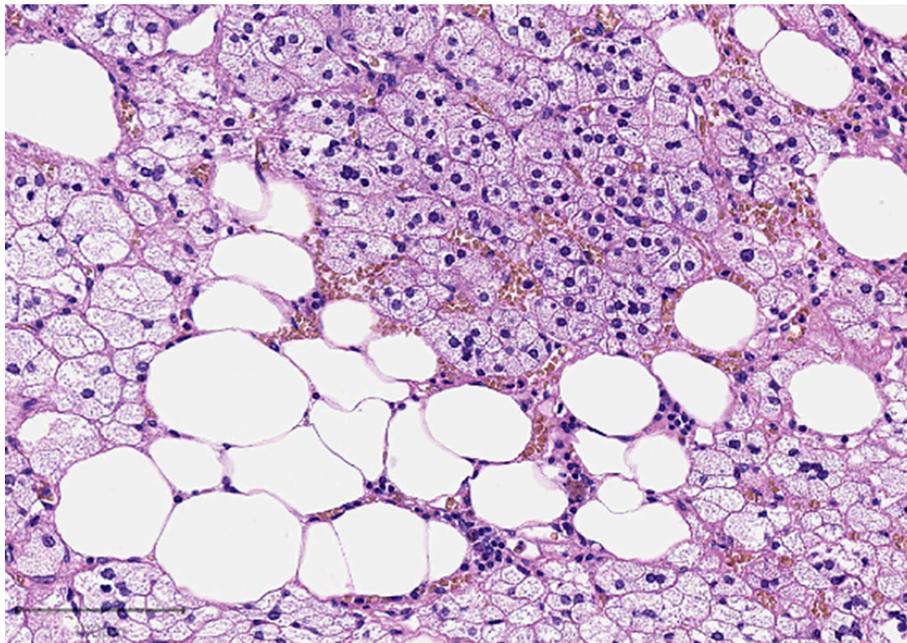


Figura 13 - Metaplasia adiposa: células adiposas maduras em meio a células claras dispostas em arranjo alveolar, 10x (Caso 3, grupo M-)

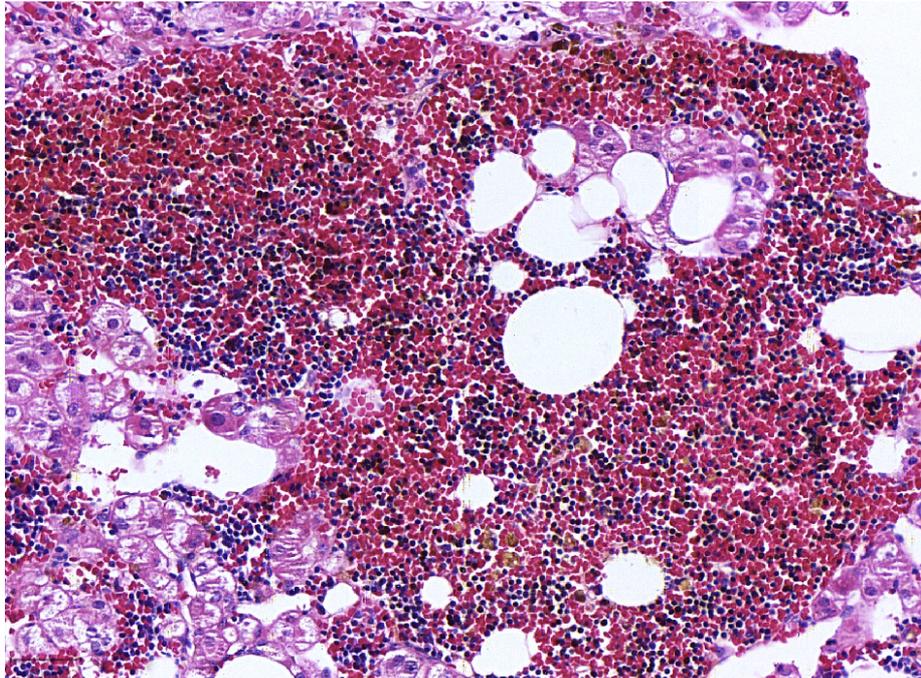


Figura 14 - Metaplasia mioelide. Proliferação de célula mioelides em meio a hemácias e metaplasia adiposa (Caso 12, M-)

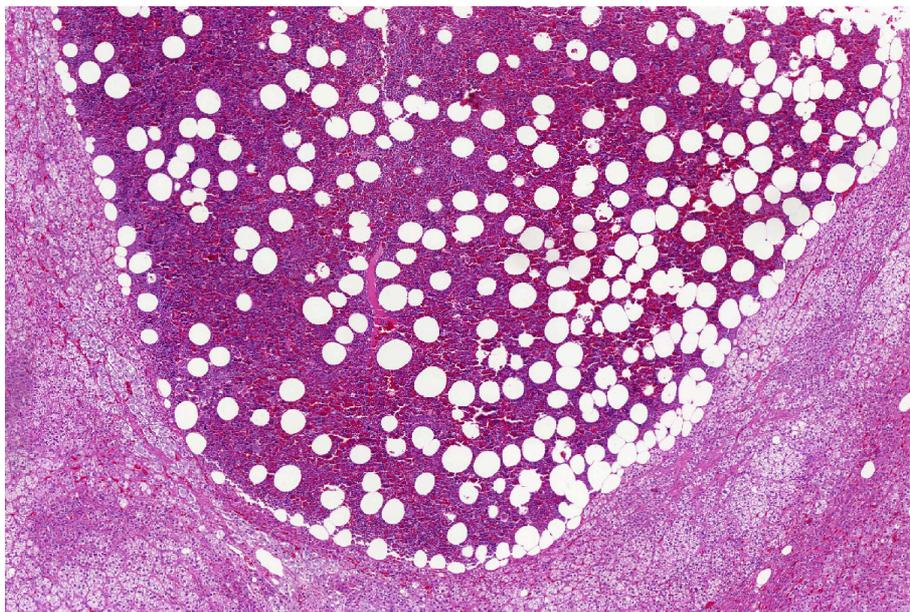


Figura 15 - Mielolipoma. Nódulo composto por tecido adiposo e células hematopoiéticas no córtex adrenal (Caso 22, M-)

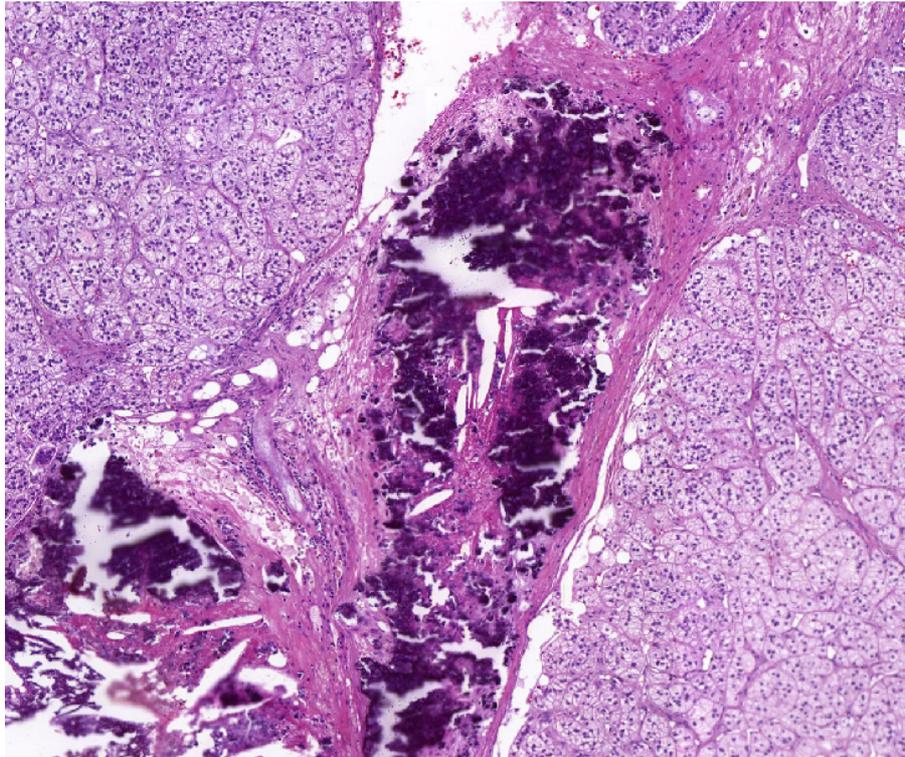


Figura 16 - Calcificações distróficas (Caso 8, M-)

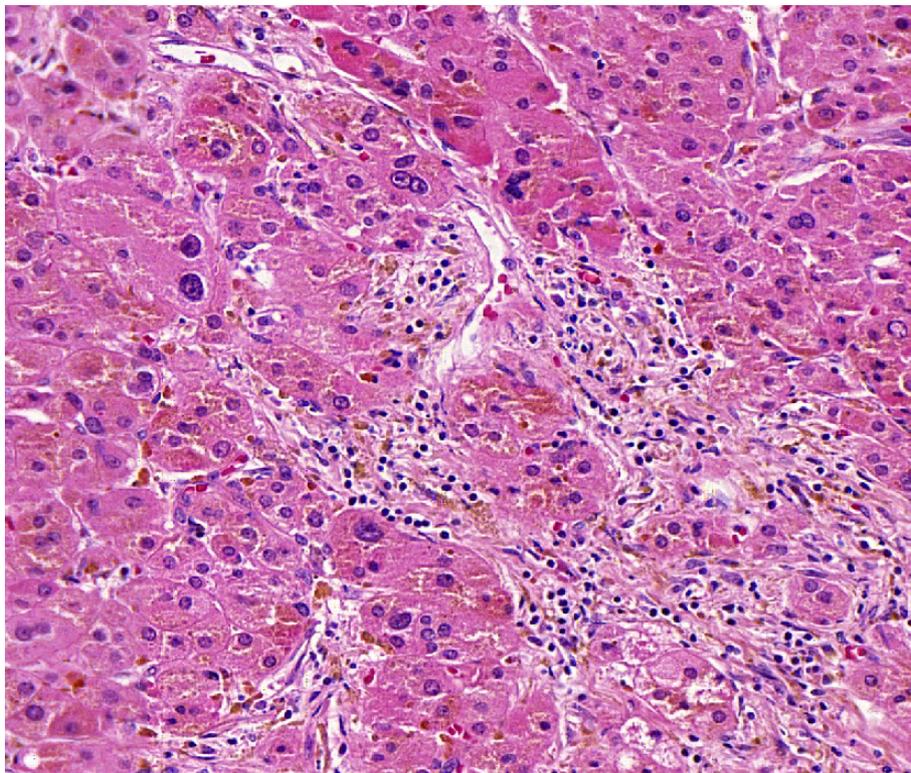


Figura 17 - Células eosinofílicas, cariomegalia, grau nuclear de Fürhman e pigmento. Células eosinofílicas apresentando cariomegalia, grau nuclear Fürhman 4 e deposição de pigmento acastanhado compatível com lipofuscina (Caso 17, M-)

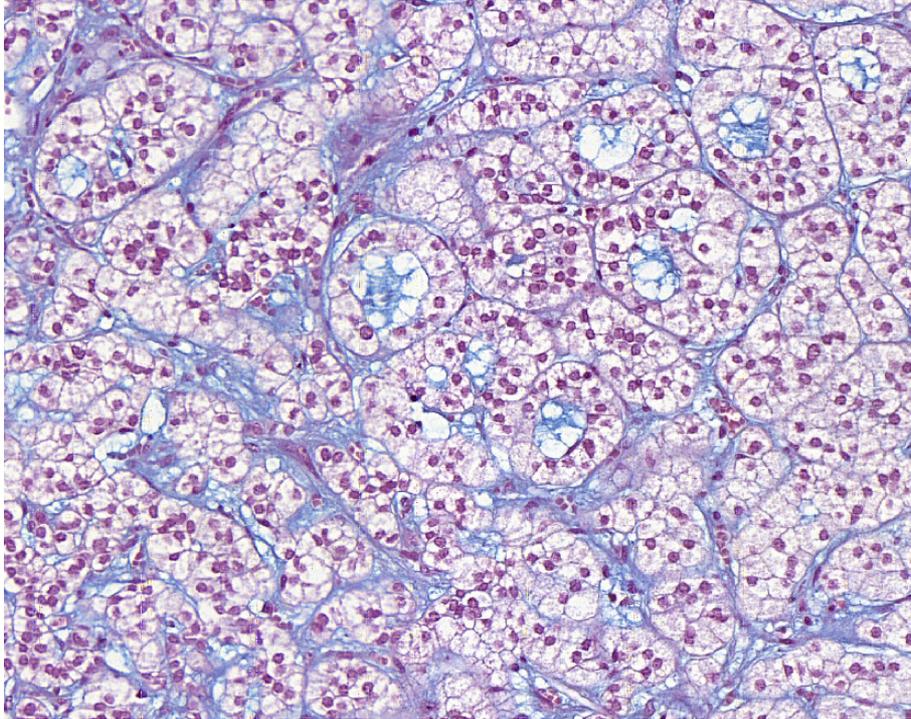


Figura 18 - Coloração histoquímica de *Alcian-blue* confirmando a presença de mucina (corada em azul) intersticial e luminal (Caso 19, M+)

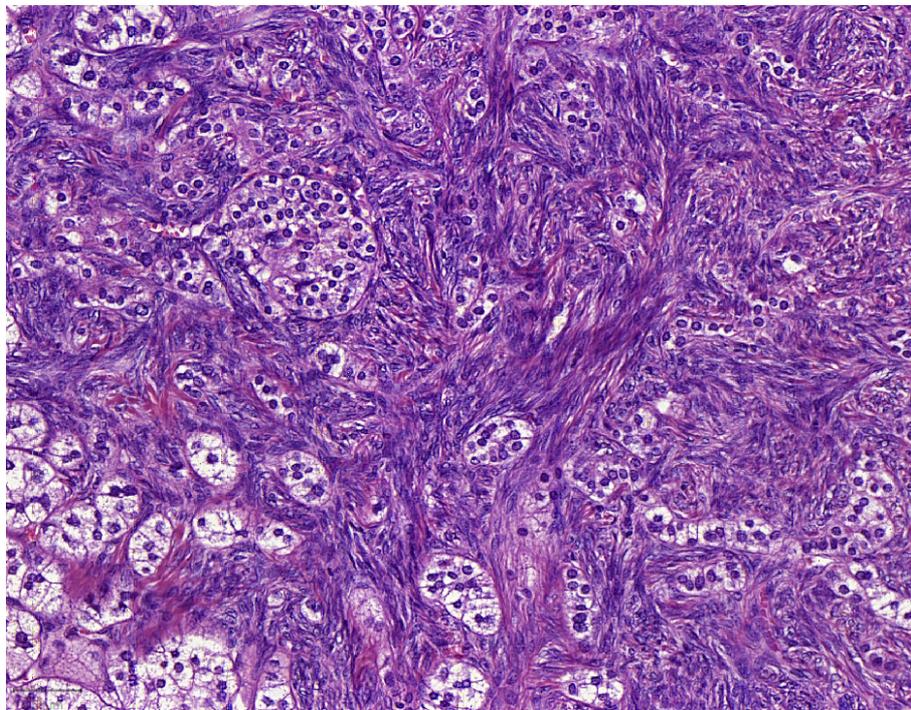


Figura 19 - Metaplasia tecal ovariana. Proliferação de células fusiformes semelhantes às células do estroma ovariano compatível com metaplasia tecal ovariana (Caso 2, M+)

Tabela 5 - Relação entre as variáveis clínicas, macroscópicas e microscópicas e o *status* mutacional

Variável	Categoria	Mutação		p
		Não N (%)	Sim N (%)	
<b>Características demográficas e clínicas</b>				
Sexo	Feminino	7 (41,2)	10 (58,8)	0,613*
	Masculino	1 (20,0)	4 (80,0)	
Idade ao diagnóstico (anos) <sup>1</sup> (média)		58,75 (7,92)	51,86 (8,46)	0,075
HAS	Não	1 (100,0)	0 (0,0)	0,364*
	Sim	7 (33,3)	14 (66,7)	
Meningioma	Não	5 (41,7)	7 (58,3)	0,505*
	Sim	0 (0,0)	3 (100,0)	
Cirurgia	Bilateral	4 (48,6)	10 (71,4)	0,386*
	Unilateral	4 (50,0)	4 (50,0)	
<b>Características macroscópicas</b>				
Lateralidade	Direita	1 (16,7)	5 (83,3)	0,351*
	Esquerda	7 (43,7)	9 (56,3)	
Peso (g) (média)**		48,10 (27,62)	84,73 (51,52)	0,229
Volume (cm <sup>3</sup> ) (média)***		107,18 (65,58)	220,91 (136,18)	0,069
<b>Características microscópicas</b>				
Padrão arquitetural	Misto	4 (22,2)	14 (77,8)	<b>0,010*</b>
	Puro	4 (100,0)	0 (0,0)	
Padrão pseudoglandular	Não	8 (100,0)	0 (0,0)	<b>&lt;0,001*</b>
	Sim	0 (0,0)	14 (100,0)	
Padrão trabecular	Não	7 (87,5)	1 (12,5)	<b>&lt;0,001*</b>
	Sim	1 (7,1)	13 (92,9)	
Padrão difuso	Não	5 (29,4)	12 (70,6)	0,309*
	Sim	3 (60,0)	2 (40,0)	
Padrão alveolar	Não	0 (0,0)	0 (0,0)	<b>NA</b>
	Sim	8 (36,4)	14 (63,6)	
Razão células claras/células compactas	<1,5	3 (75,0)	1 (25,0)	0,117*
	≥1,5	5 (27,8)	13 (72,2)	
Tipos histológicos (Hsiao)	1	3 (37,5)	5 (62,5)	1,000*
	2	4 (30,8)	9 (69,2)	
Extensão extracapsular	Ausente	6 (100,0)	0 (0,0)	<b>&lt;0,001*</b>
	Presente	2 (12,5)	14 (87,5)	
Adrenalite	Ausente/Leve	5 (27,8)	13 (72,2)	0,117*
	Moderada/Intensa	3 (75,0)	1 (25,0)	
Grau de Fürhman	1-2	6 (35,3)	11 (64,7)	1,000*
	3-4	2 (40,0)	3 (60,0)	
Citomegalia	Negativo	5 (31,2)	11 (68,8)	0,624*
	Positivo	3 (50,0)	3 (50,0)	
Metaplasia adiposa	Não	3 (75,0)	1 (25,0)	0,117*
	Sim	5 (27,8)	13 (72,2)	
Presença de mitoses	Não	6 (33,3)	12 (66,7)	0,602*
	Sim	2 (50,0)	2 (50,0)	

\*Nível de significância estatística segundo o teste exato de Fisher; \*\*Nível de significância estatística segundo o teste de Mann-Whitney (não paramétrico) (variáveis sem distribuição normal); \*\*\*Nível de significância estatística segundo o teste t de Student para amostras independentes (variáveis com distribuição normal)

#### 4.4 Imuno-histoquímica

##### 4.4.1 Proliferação e apoptose

Os resultados das reações imuno-histoquímicas utilizando-se o anticorpo anti-Ki-67, para quantificação do índice proliferativo (%) e a contagem mitótica em 50 campos de grande aumento (CGA), são apresentados na tabela 6 e exemplificados na figura 20. Na maioria dos casos (18/22) não foi observada nenhuma figura mitótica, e o índice proliferativo avaliado pela imunoexpressão do Ki-67 esteve abaixo de 4%, sendo <1% em 11/22 casos. Em apenas 1 caso (caso 8), o índice mitótico foi de 2, com um índice proliferativo (Ki-67) de 3,89%.

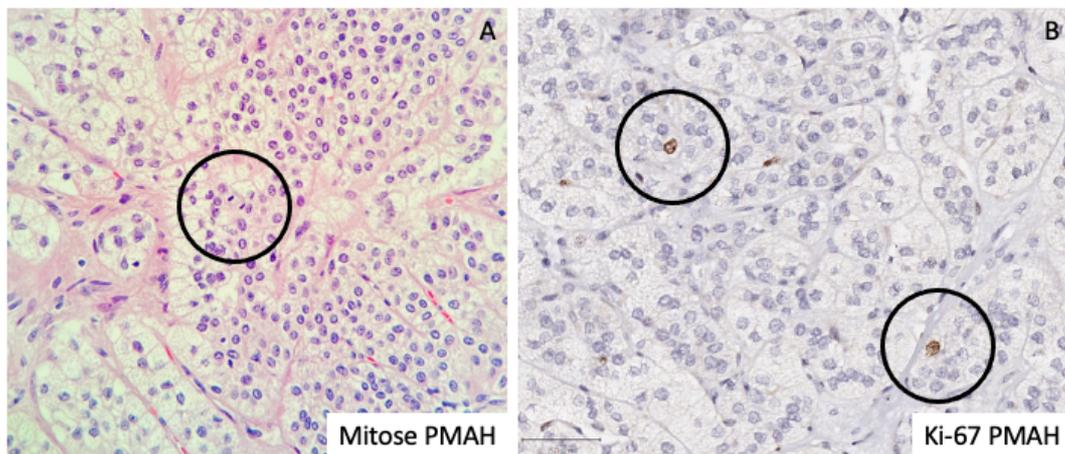


Figura 20 - Mitose e índice de proliferação celular (Ki-67)

A – Figura de mitose identificada no (Caso 8, M-) e índice proliferativo (Ki-67) no (Caso 4, M+)

Tabela 6 - Índice mitótico (nº mitoses/50CGA) e índice proliferativo Ki-67 (%)

Casos	Grupo	Índice mitótico (50CGA)	Ki-67 (%)
1	M+	0	1,63
2	M+	1	1,93
3	M-	0	0,16
4	M+	1	2,04
5	M+	0	0,42
6	M-	0	0,60
7	M+	0	2,49
8	M-	2	3,89
9	M-	0	1,29
10	M+	0	0,95
11	M+	0	0,20
12	M-	0	0,31
13	M+	0	0,87
14	M+	0	0,84
15	M+	0	0,58
16	M-	1	0,75
17	M-	0	1,25
18	M+	0	2,80
19	M+	0	0,38
20	M+	0	1,45
21	M+	0	2,90
22	M-	0	1,88

Não foi observada diferença estatisticamente significativa nos parâmetros índice mitótico e índice proliferativo (Ki-67) entre os grupos M+ e M-, assim como entre o grupo de adrenais e o grupo de adrenais portadoras de PMAH e as adrenais utilizadas como controle (tabelas 7 e 8).

Tabela 7 – Médias e respectivos desvios-padrão das variáveis e índice proliferativo Ki-67 (%) segundo o *status* de mutação

Variável	Mutação		p*
	Não N (%)	Sim N (%)	
Ki-67	1,27 (1,20)	1,39 (0,92)	0,786

\*Nível de significância estatística segundo o teste t de *Student* para amostras independentes (variáveis com distribuição normal)

Tabela 8 - Médias e respectivos desvios-padrão da marcação de Ki-67 segundo o grupo (controle ou casos)

Variável	Grupo		p*
	Normais N (%)	Casos N (%)	
Ki-67	1,42 (0,68)	1,35 (1,01)	0,821

\*Nível de significância estatística segundo o teste t de *Student* (variáveis com distribuição normal)

#### 4.4.2 Apoptose: BCL2 e BAX

A avaliação do anticorpo anti-BCL-2 mostrou positividade difusa em padrão citoplasmático na medular da adrenal em todos os casos controle e em todos os casos de PMAH onde a camada medular estava presente (figura 21, A e B). Para confirmar que se tratava da camada medular fizemos a pesquisa imuno-histoquímica com o anticorpo anti-cromogranina, um marcador de células neuroendócrinas, confirmando assim a positividade de BCL-2 na mesma área marcada pela Cromogranina (figura 21, C e D). Em nenhum dos casos foi identificada imunoexpressão de BCL-2 pelas células adrenocorticais.

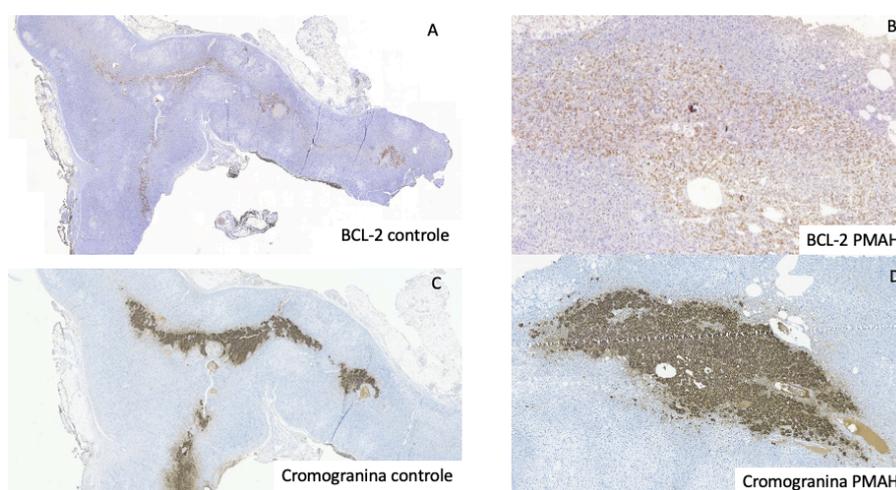


Figura 21 - Imunoexpressão de BCL-2 na medular da adrenal

A e B: Imunoexpressão de BCL-2 na camada medular de uma amostra de glândula suprarrenal normal (A) e em um caso de PMAH (caso 22, M-) (B). C e D: Imunoexpressão de cromogranina nas mesmas amostras de A e B, confirmando tratar-se da camada medular da adrenal

Todos os casos estudados mostraram positividade difusa para BAX nas células adrenocorticais (figura 22, B) não sendo possível identificar diferenças entre os grupos M+ e M- ou entre os casos de PMAH e de controle.

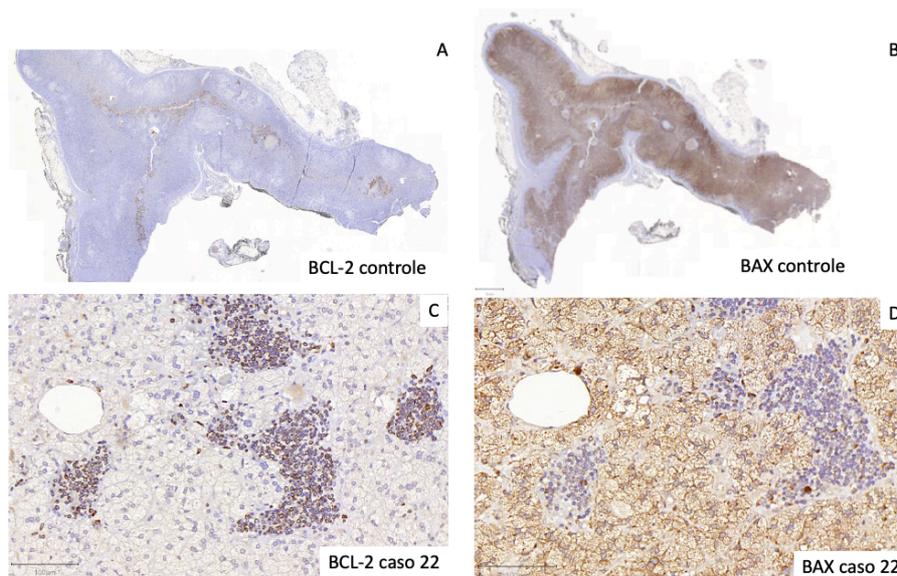


Figura 22 - Imunoexpressão de BAX e BCL-2

A e B: Negatividade para BCL-2 pelas células adrenocorticais (A) e imunoexpressão difusa de BAX pelas mesmas células (B). C e D: Detalhe da negatividade para BCL-2, com controle positivo de linfócitos (adrenalite) em caso de PMAH (caso 22, M-) (C) e imunoexpressão difusa de BAX na mesma área, com controle negativo nos linfócitos (D)

#### 4.4.3 Esteroidogênese

O anticorpo anti-SF-1, relacionado a esteroidogênese, demonstrou positividade difusa nuclear em todas as células da cortical da adrenal, não havendo distinção entre os casos dos grupos M+ e M- e entre o grupo controle (figura 23).

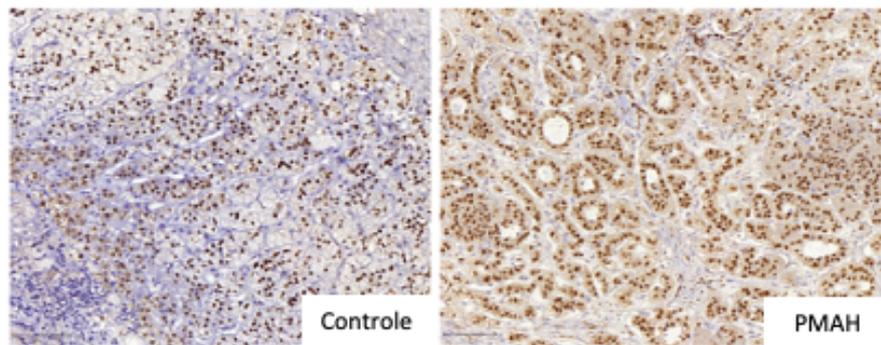


Figura 23 - Imunoexpressão de SF-1

Imunoexpressão difusa de SF-1, em padrão nuclear, nas células do córtex adrenal de um caso controle e na PMAH (Caso 19, M+).

A imunoexpressão de CYP11B1 foi difusamente observada na camada fasciculada de todas as adrenais do grupo controle. Não foram observadas associações estatisticamente significativas entre os grupos (casos ou normais) e a variável CYP11B1.

Nos nódulos dos espécimes de PMAH observou-se positividade citoplasmática difusa para CYP11B1 nas células claras e compactas nos 22 casos estudados, não havendo distinção entre os grupos com (M+) e sem mutação (M-). Não foram observadas associações estatisticamente significativas entre a presença de mutação e a expressão de CYP11B1 avaliada pela imuno-histoquímica.

O anticorpo anti-CYP11B2 foi expresso nas 11 adrenais controle. Foi identificada positividade citoplasmática em grupamentos isolados subcapsulares, únicos ou múltiplos denominados *aldosterone producing cell clusters* (APCCs) na camada glomerulosa. Um único caso controle apresentou padrão de positividade contínuo na camada glomerulosa. Dentre os casos de PMAH, observou-se positividade para CYP11B2 em 10 dos 22 casos estudados, sendo seis casos do grupo M+ e quatro casos do grupo M-, não sendo observada associação estatisticamente significativa. Dos 10 casos positivos para CYP11B2, nove apresentavam mais de um grupamento positivo (5M+ e 4 M-) e um caso (M+) apresentou um único grupamento positivo para CYP11B2. Houve associação

estatisticamente significativa entre os grupos (controle x casos) e a marcação imunohistoquímica de CYP11B2 ( $p=0,002$ ). Nos casos de PMAH a imunoposição de CYP11B2 foi menos frequente que no grupo controle.

Comparando-se o padrão de imunoposição da CYP11B1 e da CYP11B2 nos casos controle, vimos que elas são mutuamente excludentes, isto é, onde há marcação de CYP11B2 não há marcação de CYP11B1, e vice-versa (figura 24). Dessa forma estes anticorpos seriam marcadores confiáveis para a identificação das zonas glomerulosa (CYP11B2) e fasciculada (CYP11B1).

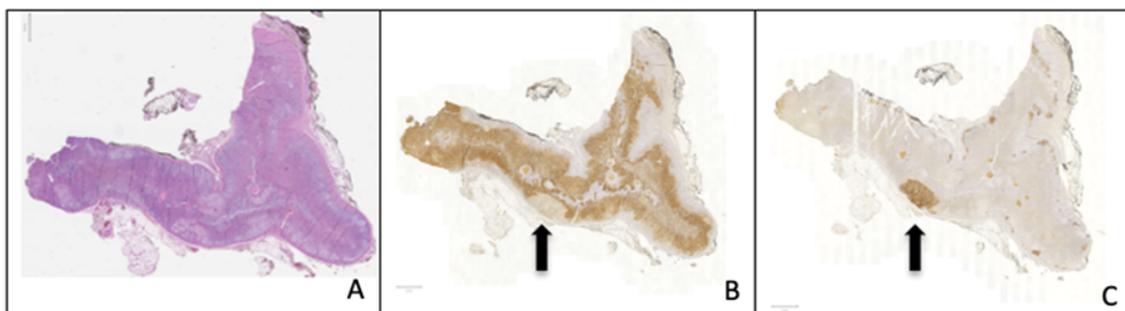


Figura 24 - Imunoposição de CYP11B1 e CYP11B2 em um caso controle

A: Corte histológico de um caso controle; B: Imunoposição citoplasmática difusa de CYP11B1 destacando a camada fasciculada; C - Imunoposição citoplasmática de CYP11B2 em múltiplos micronódulos (APCCs) na zona glomerulosa. No grupamento maior marcado para CYP11B2 é possível observar que a mesma região na CYP11B1 (B) é negativa (setas)

#### 4.4.4 ACTH

A imunoposição de ACTH foi observada na medular de 10 dos 11 casos controle estudados e em 4 dos 22 casos de PMAH, sendo 3 do grupo M+ e 1 do grupo M- (figura 25). Não foi observada imunoposição de ACTH em células da cortical adrenal em nenhum dos casos controle e de PMAH (figura 26). Houve associação estatisticamente significativa entre os grupos (controle x casos) e a marcação imunohistoquímica de ACTH ( $p<0,001$ ) na camada medular.

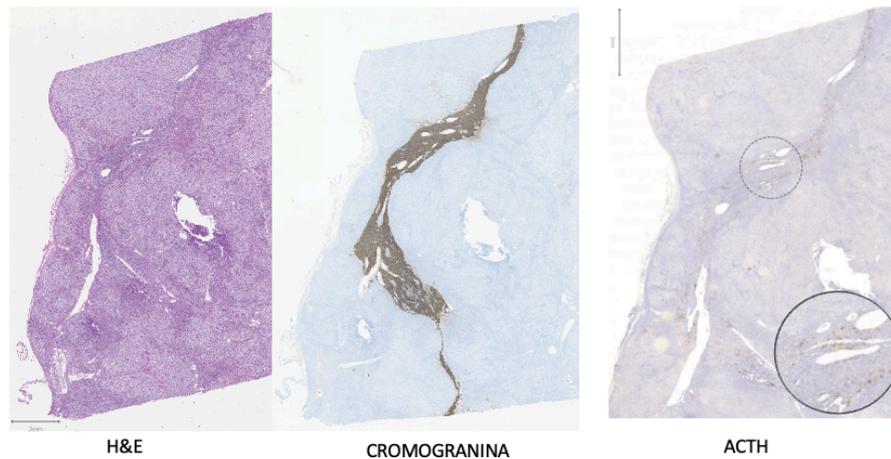


Figura 25 - Imunoexpressão de ACTH na região medular da adrenal na PMAH: a imunoexpressão de cromogranina na mesma área confirma a origem na camada medular da adrenal (Caso 7, M+)

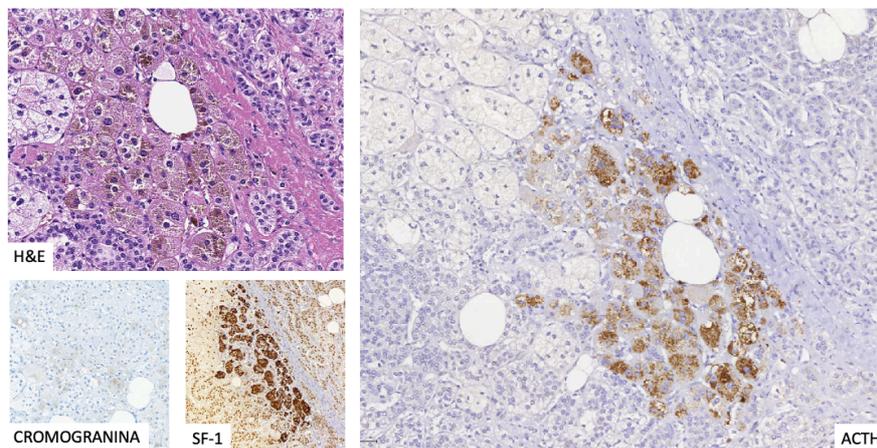


Figura 26 - Negatividade para ACTH nas células adrenocorticais

Microfotografias nas quais observamos a presença de pigmento granular acastanhado no citoplasma de células grandes e com citoplasma vacuolizado, característico das células do córtex adrenal, na coloração de H&E. Observamos então, na mesma área, impregnação inespecífica conferindo uma interpretação falso-positiva na imunocoloração de ACTH, e negatividade para cromogranina na mesma área. Na lâmina imunomarcada com anti-SF-1 vemos positividade nuclear associada a impregnação inespecífica citoplasmática (Caso 19, M+).

#### 4.4.5 ARMC5

A imunoexpressão positiva de ARMC5 foi identificada em seis casos de PMAH, sendo quatro do grupo M+ e 2 do grupo M-. Nos casos controle foi observada positividade citoplasmática difusa em células adrenocorticais de todos os casos (11/11) (figura 27).

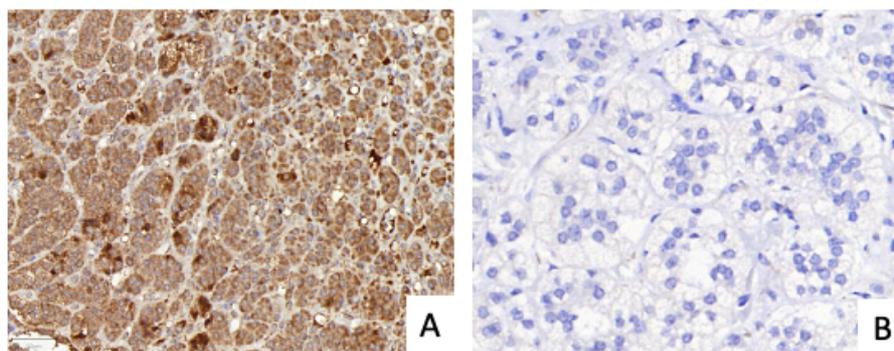


Figura 27 - Imunoexpressão de ARMC5 – A: imunoexpressão citoplasmática difusa em células adrenocorticais de um caso controle; B: perda de expressão de ARMC5 (Caso 1, M+)

Houve associação estatisticamente significativa entre os grupos (controle e portadores de PMAH) e a marcação imuno-histoquímica de ARMC5 ( $p < 0,001$ ), CYP11B2 ( $p = 0,002$ ) e ACTH ( $p < 0,001$ ). Para a variável CYP11B1 não houve associação estatisticamente significativa entre os grupos (controle e portadores de PMAH) (tabela 9).

Tabela 9 - Número e porcentagem de pacientes segundo os grupos (controle ou PMAH) e imunoexpressão de CYP11B1, CYP11B2, ACTH e ARMC5

Variável	Categoria*	Grupo (%)		p**
		Controle N (%)	PMAH N (%)	
CYP11B1	4	0 (0,0)	1 (4,5)	1,000
	5	11 (100,0)	21 (95,5)	
CYP11B2	0	0 (0,0)	12 (54,6)	<b>0,002</b>
	1	11 (100,0)	10 (45,4)	
ACTH	Negativo	1 (9,1)	18 (81,8)	<b>&lt;0,001</b>
	Positivo***	10 (90,9)	4 (18,2)	
ARMC5	Negativo	0 (0,0)	16 (72,7)	<b>&lt;0,001</b>
	Positivo	11 (100,0)	6 (27,3)	

\* Categoria 0: ausência de expressão; Categoria 1: imunoexpressão em 1 a 5% das células; Categoria 2: imunoexpressão em 6 a 25% das células; Categoria 3: imunoexpressão em 26 a 50% das células; Categoria 4: imunoexpressão em 51 a 75% das células; Categoria 5: imunoexpressão em mais de 75% das células.

\*\* Nível de significância estatística segundo o teste exato de Fisher.

\*\*\* ACTH: positividade citoplasmática observada somente na camada medular da adrenal

No grupo de pacientes com PMAH, não foram observadas associações estatisticamente significativas entre os grupos M<sup>+</sup> e M<sup>-</sup>, para os marcadores de imunohistoquímica: CYP11B1, CYP11B2, ACTH e ARMC5 (tabela 10).

Tabela 10 - Número e porcentagem de pacientes com PMAH segundo a presença de mutação e imunexpressão de CYP11B1, CYP11B2, ACTH e ARMC5

Variável	Categoria*	Mutação (%)		p**
		Não N (%)	Sim N (%)	
CYP11B1	4	0 (0,0)	1 (100,0)	1,000
	5	8 (38,1)	13 (61,9)	
CYP11B2	0	4 (33,3)	8 (66,7)	1,000
	1	4 (40,0)	6 (60,0)	
ACTH	Negativo	7 (38,9)	11 (61,1)	1,000
	Positivo	1 (25,0)	3 (75,0)	
ARMC5	Negativo	6 (37,5)	10 (62,5)	1,000
	Positivo	2 (33,3)	4 (66,7)	

\*Categoria 0: ausência de expressão; Categoria 1: imunexpressão em 1 a 5% das células; Categoria 2: imunexpressão em 6 a 25% das células; Categoria 3: imunexpressão em 26 a 50% das células; Categoria 4: imunexpressão em 51 a 75% das células; Categoria 5: imunexpressão em mais de 75% das células.

\*\*Nível de significância estatística segundo o teste exato de Fisher

## 5. DISCUSSÃO

---

No presente estudo, avaliamos as características morfológicas macro e microscópicas de 22 amostras de pacientes com diagnóstico de PMAH, na tentativa de caracterizar possíveis alterações morfológicas e imuno-histoquímicas relacionadas à presença de variantes alélicas patogênicas do gene *ARMC5*. De maneira geral, os achados macroscópicos como peso, volume, tamanho e presença de macronódulos coalescentes distorcendo difusamente o parênquima adrenal, são compatíveis com a descrição feita por Kirschner *et al.*<sup>13</sup>, em 1964. Do ponto de vista microscópico, a presença de extensão extracapsular e a presença de padrões arquiteturais trabecular e pseudoglandular, achados frequentes em nossos espécimes, embora não faça parte da descrição original feita por Kirschner, já são achados bem estabelecidos nessa doença como descrito no capítulo de nódulos corticais adrenais e lesões tumorais da série AFIP<sup>62</sup> e na descrição de Aiba *et al.* (1991)<sup>63</sup>.

Trata-se, portanto, de uma doença cujo diagnóstico é essencialmente clínico-laboratorial e radiológico, e de difícil detecção precoce, já que os sintomas iniciais são discretos ou indetectáveis. Essa dificuldade diagnóstica explica tanto a grande frequência de diagnósticos incidentais, como pode ser uma das razões que expliquem a baixa incidência dessa doença na população geral.

Do ponto de vista de evolução da doença a dificuldade em identificar o seu início nos leva a pensar sobre o crescimento da glândula e se um tempo de evolução maior estaria relacionado a glândulas maiores.

Em nossa casuística o paciente de número quatro era o mais jovem, com 41 anos de idade e apresentava uma glândula adrenal com peso de 74,2g e volume de 240 cm<sup>3</sup>. Já o mais velho, paciente número 17, tinha 69 anos de idade, uma glândula adrenal pesando 31,5g e com volume de 79,2 cm<sup>3</sup>. Comparando somente esses dois casos, embora não tenhamos como saber quando a doença de fato se iniciou em cada um deles, podemos

inferir que o tempo de evolução pode não ser o mais importante. Observamos então, que o paciente de número quatro era portador de uma variante alélica patogênica do gene *ARMC5* (grupo M+) e o paciente de número 17, não apresentava alteração genética relacionada ao gene *ARMC5* (grupo M-). Embora estejamos falando de um único caso e não tenhamos encontrado relação estatisticamente significante entre as variáveis peso, volume e a presença de mutação, a presença de uma alteração genética patogênica no gene *ARMC5* poderia ajudar a explicar a fisiopatologia da PMAH e o crescimento exagerado das glândulas.

Em 1995, Sasano *et al.*<sup>64</sup> publicaram um estudo sobre o *turn over* celular e o balanço entre proliferação e morte celular nas glândulas adrenais normais. Na época, conhecia-se a teoria de migração centrípeta ou de migração celular proposta por Gottschau em 1983, na qual, a partir da observação de um maior índice mitótico identificado nas camadas superiores/externas do córtex adrenal, defendia que estas células da camada superior do córtex adrenal migrariam em direção à região medular. Contrapondo-se a esta teoria havia também a teoria zonal na qual se propunha que cada zona do córtex adrenal se proliferaria independentemente.<sup>65</sup> Estes estudos foram realizados em glândulas adrenais de camundongos e Sasano *et al.*<sup>64</sup> se propuseram a testar esses modelos em glândulas adrenais ressecadas de pacientes com carcinoma renal. Em seus resultados encontraram um índice proliferativo (Ki-67) maior na camada superior da zona fasciculada confirmando a teoria da migração celular ou teoria centrípeta. Observaram ainda, que nas adrenais normais a replicação celular ocorria de maneira organizada enquanto nos espécimes de adenoma ou carcinoma a distribuição era irregular.

Em nossas amostras a presença de mitoses foi um evento raro e o índice proliferativo (Ki-67) em geral, muito baixo, tanto nos casos controle como nos casos de PMAH, não sendo possível observar essa distribuição celular centrípeta como descreveu

Sasano, mesmo nas glândulas normais, uma vez que nas glândulas com PMAH essa organização arquitetural é perdida. Dessa forma, o aumento da glândula não nos parece estar relacionado ao aumento significativo do índice mitótico ou do índice proliferativo (Ki-67).

Do ponto de vista da apoptose, a literatura recente indica que o gene *ARMC5* seja um gene supressor tumoral uma vez que levaria ao desenvolvimento de tumores quando há uma alteração primária em um de seus alelos germinativos e um evento secundário esporádico ocorre em um outro alelo<sup>35</sup>.

Em nosso estudo, a pesquisa da imunexpressão do anticorpo anti-*ARMC5* por imuno-histoquímica mostrou positividade difusa citoplasmática em todos os casos controle de glândula adrenal indicando indiretamente que o gene estaria ativado. Já nos casos de PMAH, identificamos perda da expressão de *ARMC5* em 16 dos 22 casos testados, mostrando uma redução significativa da proteína *ARMC5* nos grupos de portadores de PMAH, quando comparada ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). Essa menor expressão da proteína poderia estar relacionada à presença da mutação inativadora do gene *ARMC5*, cuja perda da função de induzir a apoptose, contribuiria para o aumento do tamanho da glândula. Não foi identificada, entretanto, diferença estatisticamente significativa na imunexpressão de *ARMC5* entre os grupos portadores de PMAH, M+ vs M-.

Além de provável inibidora da apoptose, a mutação do gene *ARMC5* também poderia estar relacionada com a regulação do ciclo celular. Em 1994, Reddy<sup>66</sup> demonstrou que o silenciamento do gene *ARMC5* leva a um aumento de RNAm da ciclina E1 (CCNE1), proteína envolvida no ciclo celular especificamente na transição G1/S. Mais recentemente, Hu *et al.*<sup>67</sup>, também demonstraram a interação do gene *ARMC5* com a proteína culina 3 (CUL3), envolvida na degradação da proteína ciclina E1, diminuindo

sua degradação<sup>68</sup>. Especula-se então, que o acúmulo de ciclina E1, tanto por estímulo de produção, como por diminuição da degradação, leve ao estímulo da transição G1/S, estimulando a replicação celular.

Por outro lado, segundo Cavalcante *et al.*<sup>37</sup>, não foi observada ativação da via MAPK/ERK, relacionada à estimulação mitogênica, nas culturas de células com gene *ARMC5* silenciado, corroborando nossos achados tanto de baixo índice proliferativo (Ki-67) como de baixo índice mitótico. Vemos assim, que a função do *ARMC5* na regulação do ciclo celular e na proliferação é complexa e ainda não está completamente estabelecida<sup>67</sup>.

Dentre os outros mecanismos relacionados à apoptose, foi avaliado neste estudo a expressão das proteínas reguladoras da via intrínseca da apoptose BCL-2 e BAX, e da proteína relacionada ao gene *TP53*, que desempenha um importante papel no controle do ciclo celular e da apoptose. Embora não tenha sido encontrada diferença entre os grupos estudados (M+ vs M-) e entre o grupo portador de PMAH e o grupo controle, encontramos alguns dados interessantes.

Em relação ao BCL-2, proteína anti-apoptótica, há poucos estudos sobre sua expressão nas glândulas suprarrenais, sendo o estudo de Fogt *et al.*<sup>69</sup>(1998), o primeiro deles. Nesse estudo, que incluía avaliação de adrenais normais e neoplásicas, observou-se expressão de BCL-2 em células do córtex adrenal, tanto nas glândulas normais como nas neoplásicas, incluindo amostras de adenomas, hiperplasias e carcinomas adrenocorticais. Em nenhum dos casos foi identificada positividade para BCL-2 na camada medular ou em espécimes de feocromocitoma. Em 2002, Bernini *et al.*<sup>70</sup>, também fizeram um estudo sobre índice proliferativo e apoptose em glândulas suprarrenais normais e neoplásicas, incluindo os marcadores Ki-67, P53 e BCL-2, no qual também observaram uma expressão de BCL-2 em células corticais da adrenal, tanto em glândulas

suprarrenais normais, como em glândulas neoplásicas, destacando uma positividade forte e difusa nos espécimes de carcinoma adrenocortical. Já a expressão da proteína p53 foi identificada somente em alguns espécimes de carcinoma adrenocortical. Em 2003, Zhang *et al.*<sup>71</sup>, estudaram a imunexpressão de BCL-2 em tumores adrenocorticais e em feocromocitomas, utilizando métodos de recuperação antigênica semelhantes aos utilizados neste estudo. Como resultado encontraram positividade focal para BCL-2 em apenas 20% dos tumores adrenocorticais (n=25) e positividade difusa para BCL-2 em 86% dos feocromocitomas (n=14).

Em nossa casuística, não identificamos expressão de BCL-2 nas células do córtex adrenal, em nenhum de nossos casos controle ou nas amostras de PMAH. Assim como também não encontramos positividade para p53. Em contrapartida, identificamos a positividade para BCL-2 na zona medular de todas as amostras de glândulas suprarrenais normais e nos espécimes de PMAH em que a camada medular estava representada, corroborando os achados de Zhang *et al.*<sup>71</sup>, em 2003.

Sobre o anticorpo anti-BAX, proteína pró-apoptótica, não encontramos dados suficientes na literatura para comparação e discussão dos resultados encontrados. Destacamos aqui, no entanto, o estudo de Kanauchi *et al.*<sup>72</sup>, que estudaram a regulação dos genes BCL-2 e BAX nos tumores adrenais (sete adrenais normais adjacentes aos tumores, 17 adenomas adrenocorticais, quatro hiperplasias, 20 feocromocitomas e quatro carcinomas adrenocorticais), através da quantificação da enzima transcriptase reversa da polimerase humana (hTERT) por RT-PCR. Como resultado identificaram expressão de BCL-2 e BAX em todos os tecidos adrenais normais e nos tumores adrenais benignos. Nos quatro casos de carcinoma adrenocortical identificou-se expressão somente de BCL-2 e aumento da expressão de hTERT. Essas técnicas, entretanto, não são técnicas *in situ*, não permitindo identificar que tipo celular está expressando essas proteínas. Em nossos

casos observamos positividade difusa de BAX nas células adrenocorticais e negatividade difusa para BCL-2 pelas mesmas células. Embora sejam trabalhos com metodologias de estudo distintas, entendemos que a regulação da apoptose e estudo da via intrínseca ainda é controversa nas glândulas suprarrenais sendo necessários mais estudos para a compreensão do controle do ciclo celular.

Além da provável função de gene supressor tumoral, o *ARMC5* também exerce uma função sobre a esteroidogênese como demonstrou Cavalcante *et al.* em seu trabalho com células de cultura de pacientes com PMAH, no qual silenciando o gene *ARMC5* a expressão de RNAm das proteínas envolvidas na esteroidogênese (StAR, CYP11A1, CYP17A1, NR5A1, SF-1 e MC2R) diminuía. De maneira análoga, a superexpressão do gene *ARMC5* levou a um aumento dos parâmetros esteroidogênicos das células em cultura, corroborando a ação do *ARMC5* na esteroidogênese adrenocortical.<sup>37</sup>

Na glândula suprarrenal normal a secreção de esteroides é regulada por uma complexa rede de interações parácrinas e autócrinas que envolvem células endoteliais, feixes nervosos, células cromafins, células imunocompetentes e células adrenocorticais<sup>73</sup>. O ACTH exerce um efeito estimulador direto nas células adrenocorticais, aumentando a secreção de hormônios esteroides (ativando o receptor da melanocortina tipo 2 - MC2R), a angiogênese (via VEGF) e o fluxo sanguíneo (via ácidos epoxieicosatrienóicos - EETs).

Além da produção hipofisária, o ACTH também pode ser produzido pelas células cromafins localizadas na região medular e atua como um importante mediador córtico-medular<sup>74, 75</sup>. Este mecanismo secretor é ativado pela hormônio estimulador da corticotrofina (CRH) também produzido, além do hipotálamo, pela medular da adrenal<sup>76</sup>. Estudos clínico-patológicos têm mostrado que a ação parácrina do ACTH, produzido pelas células cromafins, exerce um papel importante na patogênese do hipercortisolismo como já descrito em feocromocitomas associados a hiperplasia adrenocortical<sup>77-79</sup>.

Na PMAH, a presença de células produtoras de ACTH em meio ao córtex adrenal foi descrita por Pereira *et al.*<sup>80</sup>,2001, que também observaram a expressão de cromogranina nestas mesmas células, sugerindo que estas fossem células cromafins intracorticais e não células adrenocorticais.

Por outro lado, a produção ectópica de ACTH por células adrenocorticais também já foi documentada em neoplasias adrenocorticais, sendo o primeiro caso de adenoma adrenocortical secretor de cortisol associado a produção de ACTH, descrito por Hiroi *et al.*<sup>81</sup>, em 2001. Mais recentemente, em um estudo com uma série de pacientes com PMAH, Louiset *et al.*<sup>82</sup> (2013), demonstraram a presença de células adrenocorticais isoladas ou agrupadas, positivas para ACTH, em todos os casos testados. Em nenhum caso foi detectada imunexpressão de cromogranina pelas mesmas células favorecendo tratar-se de células do córtex adrenal, e afastando a possibilidade de se tratar de células cromafins. Além disso, demonstrou também que a produção intra-adrenal de ACTH não é regulada, pelo cortisol, como ocorre com o ACTH hipofisário. A ausência dessa alça inibitória, via *feed-back* negativo, justificaria uma produção sustentada e constante de ACTH e conseqüentemente, de cortisol, pela glândula suprarrenal.

Em nossa casuística, a análise inicial das lâminas imunomarcadas com anti-ACTH mostrou positividade em alguns grupamentos de células adrenocorticais. No entanto, analisando a mesma área na lâmina corada pela H&E e nas lâminas imunomarcadas pelo SF-1 e cromogranina, observamos tratar-se de um resultado falso positivo. A presença de um pigmento granular acastanhado, provavelmente lipofuscina, ocasionalmente presente nas células adrenocorticais (figura 24), causou uma impregnação inespecífica o que resultou numa interpretação inicial equivocada da positividade para ACTH em células adrenocorticais. A positividade nuclear para SF1, associada a negatividade para a cromogranina, confirmou a linhagem adrenocortical dessas mesmas células. Revendo

todos os casos constatamos a imunexpressão de ACTH somente em células da medular da adrenal. Em todos os casos controle também foi observada a imunexpressão de cromogranina e ACTH apenas pela medular.

Nossos achados enfatizam a importância de uma revisão do papel do ACTH na regulação autócrina/parácrina da secreção de esteroides adrenais, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. O ACTH produzido pelas células adrenais cromafins pode exercer um papel importante nessa interrelação funcional córtico-medular. A hipótese de um distúrbio nessa importante relação funcional córtico-medular na PMAH, levando a um distúrbio na secreção do cortisol, nos parece um relevante caminho a ser mais bem investigado na PMAH, onde a relação topográfica entre essas duas regiões da glândula encontra-se profundamente alterada pelo crescimento desordenado dos nódulos adrenocorticais hiperplásicos. Neste estudo, pelo menos, o ACTH de origem nas células cromafins medulares nos parece mais relevante do que aquele produzido pelas próprias células adrenocorticais, não detectado em nenhum dos casos estudados nesta série, nem tampouco em glândulas normais.

Uma outra linha de investigação, não abordada neste estudo, avalia um outro mecanismo fisiopatológico envolvido na gênese do hipercortisolismo na PMAH, que seria a presença de receptores aberrantes/ilícitos do ACTH, como 5-HT, GIP e LH. Como resultado, a produção de cortisol, seria ativada de maneira contínua e autossustentada pelas células adrenocorticais contribuindo para a manutenção do hipercortisolismo e justificando a ausência de supressão com altas doses de dexametasona<sup>83</sup>. Além da produção de esteroides, a estimulação dos receptores MC2R, eutópicos e ectópicos pelo ACTH autócrino/parácrino, também estimularia a produção de VEGF e de EETs. Em ambos os casos haveria estímulo ao aumento da glândula, tanto por aumento da

angiogênese (VEGF) como por aumento do fluxo sanguíneo intra-adrenal (EETs), com consequente aumento da produção de esteroides.

Na tentativa de melhor compreender o crescimento das glândulas adrenais dos adultos, esse mecanismo tem sido estudado em três situações: regeneração, crescimento compensatório em resposta a retirada de uma das adrenais e crescimento celular em resposta ao ACTH<sup>84</sup>. Em relação a regeneração, estudos realizados após a enucleação bilateral das adrenais de camundongos mostram que as células corticais subcapsulares permanecem intactas e um grande coágulo se forma no interior das glândulas. A capacidade de desdiferenciação destas células levaria a regeneração da glândula a semelhança do que ocorre no fígado. Já a região medular não se regenera, embora algumas células cromafins remanescentes possam ser identificadas<sup>85-87</sup>.

No segundo mecanismo, a remoção de uma das glândulas adrenais levaria a proliferação das células corticais da camada glomerulosa e da camada fasciculada externa da glândula adrenal remanescente. Este fenômeno é conhecido como crescimento adrenal compensatório (CAC), um mecanismo neuralmente mediado pelo SF-1<sup>88</sup>. O terceiro mecanismo de crescimento celular está relacionado ao ACTH. Embora já esteja bem estabelecido que o ACTH hipofisário seja necessário para a manutenção do peso da adrenal, as vias de sinalização que regulam o tamanho celular e o número de células é complexa e necessita mais estudos. Alguns trabalhos mostram que o ACTH inibe a proliferação das células imaturas/primárias do córtex adrenal e bloqueiam a progressão das células adrenocorticais da fase G1 do ciclo celular, inibindo a síntese de DNA da fase S<sup>89</sup>. Apesar desse mecanismo inibitório no crescimento, o ACTH induz a expressão dos genes *C-fos* e *C-jun*, relacionados à progressão do ciclo celular<sup>90</sup>. Embora esses estímulos pareçam paradoxais eles levantam a possibilidade de que o ACTH pode modular a expressão nuclear de genes/fatores de transcrição. Um outro fator importante no

crescimento celular é o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2), um polipeptídeo da família dos fatores de crescimento, envolvida no remodelamento de feridas, angiogênese e reparo ósseo. Assim como o ACTH, o FGF2 também promove a proliferação adrenocortical via ativação de *C-fos* e *C-jun*.

Por definição, a hiperplasia corresponde a um aumento do número de células de um tecido ou órgão e está frequentemente relacionada a hipertrofia (aumento do tamanho celular). Já neoplasia pode ser definida como um crescimento celular excessivo, não coordenado e que persiste mesmo após a interrupção do estímulo que originou suas alterações<sup>3</sup>. Quando a adrenal se torna hiperplásica isso pode levar a uma hiperfunção.

Na PMAH observamos um aumento exagerado do tamanho da glândula, preferencialmente bilateral e com formação de macronódulos. Microscopicamente a desorganização arquitetural é evidente, não sendo possível distinguir as zonas glomerulosa, fasciculada e reticulada. A medular também fica deslocada e comprimida entre os nódulos, podendo não ser identificada nos diferentes cortes do espécime. Áreas de extensão extracapsular também são frequentes, indicando uma ativação exagerada do crescimento celular nessa doença. Quando comparamos os grupos M+ e M-, observamos um predomínio de padrões citoarquiteturais de tipos pseudoglandular e trabecular, e presença de extensão extracapsular no grupo (M+).

A existência de um mecanismo autônomo e autossustentado de secreção hormonal e de estímulo a fatores de crescimento, associado ao crescimento exagerado, com intensa desorganização arquitetural e a capacidade de infiltração dos tecidos adjacentes, são características compartilhadas com os processos proliferativos de natureza neoplásica.

Nessa linha de reflexão, parâmetros como o padrão pseudoglandular e a frequente extensão extracapsular, associados a presença da mutação do gene *ARMC5* (características com significância estatística), são achados que indicariam uma possível

situação intermediária dessa doença entre as hiperplasias e as neoplasias relacionadas a esse gene. A dificuldade de se definir uma patogênese para a doença, também reforça essa hipótese, de uma doença com capacidade proliferativa e funcional autônomas. Embora nossa casuística seja pequena, a presença desses padrões incomuns na PMAH pode indicar a presença da mutação *ARMC5*, em particular o padrão pseudoglandular, observado exclusivamente nos casos M+ e podem ser considerados marcadores índices para a pesquisa de mutações do *ARMC5* nos pacientes portadores de PMAH.

Do ponto de vista genético, estudos recentes com sequenciamento de última geração (NGS, do inglês, *next-generation sequencing*) têm mostrado que a PMAH é causada por mutações germinativas seguidas por uma mutação somática (*second-hit*), sugerindo fortemente que se trate de uma doença neoplásica e não hiperplásica. As mutações envolvendo o gene *ARMC5* estão entre as mais comuns, estando presentes em 25-55% dos casos<sup>91</sup>. De acordo com a última edição (2022) do livro de classificação do tumores endócrinos da OMS (Organização Mundial da Saúde), a PMAH foi introduzida no capítulo de doenças adrenocorticais nodulares, com a nomenclatura atualizada para doença adrenocortical macronodular bilateral<sup>92</sup>.

Embora os recentes avanços no entendimento da fisiopatologia da PMAH e da identificação de grupos de pacientes com PMAH associados à presença de mutações do gene *ARMC5* (25 a 55%) e um pequeno grupo com PMAH associado a mutações no gene *KDM1A* (raro), ainda há porcentagem considerável de pacientes com PMAH cuja fisiopatologia ainda não está completamente estabelecida.

## **6. CONCLUSÕES**

---

De maneira geral, os achados macro e microscópicos, como a presença de macronódulos coalescentes distorcendo difusamente o parênquima adrenal, são compatíveis com a descrição feita por Kirschner *et al.*<sup>13</sup>, em 1964. Essas alterações foram observadas em todos os casos, sendo identificada uma tendência de maior peso, maior tamanho e maior volume nos espécimes dos grupos com a mutação do gene *ARMC5*.

O aumento desorganizado do volume da glândula adrenal na PMAH não se mostrou relacionado a aumento da proliferação celular (índice mitótico e índice proliferativo – Ki-67), ou alterações nas proteínas reguladoras da apoptose, utilizando-se como parâmetros a expressão proteica de BCL2 e BAX.

Os padrões histológicos citoarquiteturais de tipos pseudoglandular e trabecular, assim como a presença de extensão extracapsular das células corticais, foram fortemente relacionados a presença da mutação do gene *ARMC5*, e associadas entre si, não tendo sido notificados na descrição original da doença.

O padrão arquitetural pseudoglandular foi observado exclusivamente nos casos com a presença das mutações no gene *ARMC5*, podendo ser um indicador morfológico da presença de mutações nesse gene.

Não se observou correlação entre os subtipos histológicos de Hsiao e a presença de mutações do gene *ARMC5*.

Alterações morfológicas observadas particularmente nos casos de PMAH associadas a presença de mutações do gene *ARMC5*, nos levam a considerar a hipótese de se tratar de uma situação biológica com comportamento intermediário entre a hiperplasia e a neoplasia.

Quando comparadas ao grupo controle de adrenais “normais”, as adrenais dos pacientes portadores de PMAH apresentaram:

- A expressão da proteína relacionada ao gene *ARMC5*, avaliada pela técnica de imuno-histoquímica, foi significativamente reduzida nas glândulas com PMAH em relação às glândulas normais.
- Negatividade para a imunopressão de ACTH nas células adrenocorticais na totalidade dos casos estudados, assim como o grupo das adrenais normais. A imunopressão dessa proteína foi observada nas áreas medulares em ambos os grupos.
- A desestruturação da relação córtico-medular na PMAH, pode ser um fator desestabilizador importante na interação funcional dessas duas regiões da glândula adrenal na PMAH, particularmente em relação ao ACTH produzido pela medular.
- Imunopressão da enzima CYP11B2, relacionada a síntese de aldosterona, em apenas metade dos casos, enquanto no grupo controle todas as adrenais expressaram essa proteína, sob a forma de micronódulos subcapsulares.

## **7. REFERÊNCIAS**

---

1. LLOYD RV. Endocrine pathology - Differential diagnosis and molecular advances. 2. ed. New York: Springer; 2010.
2. Hench PS, Kendall EC. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Proc Staff Meet Mayo Clin.* 1949;24(8):181-97.
3. Kumar N, Abbas K. A, Fausto N, Aster C. J. Patologia Bases Patológicas das Doenças. 8. ed. São Paulo: Elsevier; 2010.
4. McPhee S, Ganong W. Fisiopatologia da doença: uma introdução à medicina clínica. 5ª ed. São Paulo: McGraw-Hill Interamericana do Brasil; 2007.
5. Kim AC, Barlaskar FM, Heaton JH, Else T, Kelly VR, Krill KT, et al. In search of adrenocortical stem and progenitor cells. *Endocr Rev.* 2009;30(3):241-63.
6. Duregon E, Fassina A, Volante M, Nesi G, Santi R, Gatti G, et al. The Reticulin Algorithm for Adrenocortical Tumor Diagnosis A Multicentric Validation Study on 245 Unpublished Cases. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(9):1433-40.
7. Lam KY, Chan AC, Lo CY. Morphological analysis of adrenal glands: a prospective analysis. *Endocr Pathol.* 2001;12(1):33-8.
8. Bogliolo L. Bogliolo Patologia. 7ª ed. 2006. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.
9. Studzinski GP, Hay DC, Symington T. Observations on the weight of the human adrenal gland and the effect of preparations of corticotropin of different purity on

- the weight and morphology of the human adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab.* 1963;23:248-54.
10. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet.* 2006;367(9522):1605-17.
  11. Brasileiro G. Bogliolo Patologia Geral. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2018.
  12. Saad AJM, Maciel BMR, Mendonça BB. Endocrinologia: Princípios e Prática. 2ª ed.: Atheneu; 2017.
  13. 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.
  14. Hsiao H-P, Kirschner LS, Bourdeau I, Keil MF, Boikos SA, Verma S, et al. Clinical and genetic heterogeneity, overlap with other tumor syndromes, and atypical glucocorticoid hormone secretion in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia compared with other adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(8):2930-7.
  15. Fragoso M, Alencar GA, Lerario AM, Bourdeau I, Almeida MQ, Mendonca BB, et al. Genetics of primary macronodular adrenal hyperplasia. *J Endocrinol.* 2015;224(1):R31-R43.
  16. Lacroix A. ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23(2):245-59.

17. Mete O, Duan K. The many faces of primary aldosteronism and Cushing syndrome: a reflection of adrenocortical tumor heterogeneity. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:54.
18. Juhlin CC, Bertherat J, Giordano TJ, Hammer GD, Sasano H, Mete O. What did we learn from the molecular biology of adrenal cortical neoplasia? From Histopathology to translational genomics. *Endocr Pathol*. 2021;32(1):102-33.
19. Stratakis CA, Kirschner LS. Clinical and genetic analysis of primary bilateral adrenal diseases (micro-and macronodular disease) leading to Cushing syndrome. *Horm Metab Res*. 1998;30(6-7):456-63.
20. 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.
21. Alencar G. Aspectos clínicos e moleculares da hiperplasia adrenal macronodular independente de ACTH em sua forma familiar. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP; 2013.
22. Rockall AG, Babar SA, Sohaib SAA, Isidori AM, Diaz-Cano S, Monson JP, et al. CT and MR imaging of the adrenal glands in ACTH-independent Cushing syndrome. *Radiographics*. 2004;24(2):435-52.
23. Verma A, Mohan S, Gupta A. ACTH-independant macronodular adrenal hyperplasia: imaging findings of a rare condition. *Abdom Imaging*. 2008;33(2):225-9.

24. Metser U, Miller E, Lerman H, Liovshitz G, Avital S, Even-Sapir E. 18F-FDG PET/CT in the evaluation of adrenal masses. *J Nucl Med*. 2006;47(1):32-7.
25. Blake MA, Slattery JM, Kalra MK, Halpern EF, Fischman AJ, Mueller PR, et al. Adrenal lesions: characterization with fused PET/CT image in patients with proved or suspected malignancy-initial experience. *Radiology*. 2006;238(3):970-7.
26. Bourdeau I. Clinical and molecular genetic studies of bilateral adrenal hyperplasias. *Endocr Res*. 2004;30(4):575-83.
27. 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.
28. Charchar HLS, Fragoso MCBV. An overview of the heterogeneous causes of Cushing syndrome resulting from primary macronodular adrenal hyperplasia (PMAH). *J Endocr Soc*. 2022;6(5):bvac041.
29. Swords FM, Noon LA, King PJ, Clark AJ. Constitutive activation of the human ACTH receptor resulting from a synergistic interaction between two naturally occurring missense mutations in the MC2R gene. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;213(2):149-54.
30. Fragoso M, Domenice S, Latronico AC, Martin RM, Pereira MAA, Zerbini MCN, et al. Cushing's syndrome secondary to adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia due to activating mutations of GNAS1 gene. *J Clin Endocrinol Metabol*. 2003;88(5):2147-51.

31. Brown RJ, Kelly MH, Collins MT. Cushing syndrome in the McCune-Albright syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(4):1508-15.
32. Almeida MQ, Azevedo MF, Xekouki P, Bimpaki EI, Horvath A, Collins MT, et al. Activation of Cyclic AMP Signaling Leads to Different Pathway Alterations in Lesions of the Adrenal Cortex Caused by Germline PRKAR1A Defects versus Those due to Somatic GNAS Mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(4):E687-E93.
33. Vezzosi D, Libe R, Baudry C, Rizk-Rabin M, Horvath A, Levy I, et al. Phosphodiesterase 11A (PDE11A) Gene defects in patients with ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH): Functional variants may contribute to genetic susceptibility of bilateral adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(11):E2063-E9.
34. Alencar GA, Lerario AM, Nishi MY, Mariani BMD, Almeida MQ, Tremblay J, et al. ARMC5 mutations are a frequent cause of primary macronodular adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(8):E1501-E9.
35. 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.
36. Berthon A, Stratakis CA. From beta-catenin to ARM-repeat proteins in adrenocortical disorders. *Horm Metab Res.* 2014;46(12):889-96.
37. Cavalcante IP, Nishi M, Zerbini MCN, Almeida MQ, Brondani VB, Botelho MLAA, et al. The role of ARMC5 in human cell cultures from nodules of primary

- macronodular adrenocortical hyperplasia (PMAH). *Mol Cell Endocrinol.* 2018;460:36-46.
38. Vaczlavik A, Bouys L, Violon F, Giannone G, Jouinot A, Armignacco R, et al. KDM1A inactivation causes hereditary food-dependent Cushing syndrome. *Genet Med.* 2022;24(2):374-83.
39. Chasseloup F, Bourdeau I, Tabarin A, Regazzo D, Dumontet C, Ladurelle N, et al. Loss of KDM1A in GIP-dependent primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia with Cushing's syndrome: a multicentre, retrospective, cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2021;9(12):813-24.
40. 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.
41. Berthon A, Bertherat J. Update of genetic and molecular causes of adrenocortical hyperplasias causing Cushing syndrome. *Horm Metab Res.* 2020;52(8):598-606.
42. Franco M, Brito Td, Bacchi CE, Almeida PC. Patologia: processos gerais. 5<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu; 2010.
43. Freel EM, Connell JM. Mechanisms of hypertension: the expanding role of aldosterone. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(8):1993-2001.
44. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S, et al. A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature.* 1992;355(6357):262-5.

45. White PC. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and its role in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Am J Med Sci.* 2001;322(6):308-15.
46. de Simone G, Tommaselli AP, Rossi R, Valentino R, Lauria R, Scopacasa F, et al. Partial deficiency of adrenal 11-hydroxylase. A possible cause of primary hypertension. *Hypertension.* 1985;7(2):204-10.
47. Honda M, Nowaczynski W, Guthrie GP, Messerli FH, Tolis G, Kuchel O, et al. Response of several adrenal steroids to ACTH stimulation in essential hypertension. *J Clin Endocrinol Metab.* 1977;44(2):264-72.
48. Fisher ND, Hurwitz S, Jeunemaitre X, Hopkins PN, Hollenberg NK, Williams GH. Familial aggregation of low-renin hypertension. *Hypertension.* 2002;39(4):914-8.
49. Fisher ND, Hurwitz S, Ferri C, Jeunemaitre X, Hollenberg NK, Williams GH. Altered adrenal sensitivity to angiotensin II in low-renin essential hypertension. *Hypertension.* 1999;34(3):388-94.
50. Griffing GT, Wilson TE, Melby JC. Alterations in aldosterone secretion and metabolism in low renin hypertension. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;71(6):1454-60.
51. Guerin C, Taieb D, Treglia G, Brue T, Lacroix A, Sebag F, et al. Bilateral adrenalectomy in the 21<sup>st</sup> century: when to use it for hypercortisolism? *Endocr Relat Cancer.* 2016;23(2):R131-R42.
52. Debillon E, Velayoudom-Cephise FL, Salenave S, Caron P, Chaffanjon P, Wagner T, et al. Unilateral adrenalectomy as a first-line treatment of Cushing's

- syndrome in patients with primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(12):4417-24.
53. Lamas C, Alfaro JJ, Lucas T, Lecumberri B, Barcelo B, Estrada J. Is unilateral adrenalectomy an alternative treatment for ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia?: long-term follow-up of four cases. *Eur J Endocrinol.* 2002;146(2):237-40.
54. Xu YZ, Rui WB, Qi YC, Zhang CY, Zhao JP, Wang XJ, et al. The role of unilateral adrenalectomy in corticotropin-independent bilateral adrenocortical hyperplasias. *World J Surg.* 2013;37(7):1626-32.
55. Srougi V, Rocha BA, Tanno FY, Almeida MQ, Baroni RH, Mendona BB, et al. The use of three-dimensional printers for partial adrenalectomy: estimating the resection limits. *Urology.* 2016;90:217-20.
56. Yoshiaki Tanno F, Srougi V, Almeida MQ, Ide Yamauchi F, Morbeck Almeida Coelho F, Nishi MY, et al. A new insight into the surgical treatment of primary macronodular adrenal hyperplasia. *J Endocr Soc.* 2020;4(8).
57. Reincke M. Subclinical Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2000;29(1):43-56.
58. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1):16878. doi: 10.1038/s41598-017-17204-5.
59. Volynskaya Z, Mete O, Pakbaz S, Al-Ghamdi D, Asa SL. Ki67 quantitative interpretation: insights using image analysis. *J Pathol Inform.* 2019;10:8.

60. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1982;6(7):655-63.
61. Fidler WJ. Ovarian thecal metaplasia in adrenal glands. *Am J Clin Pathol.* 1977;67(4):318-23.
62. Lack EE. Tumors of the adrenal glands and extraadrenal paraganglia: American Registry of Pathology; 2007.
63. Aiba M, Hirayama A, Iri H, Ito Y, Fujimoto Y, Mabuchi G, et al. Adrenocorticotrophic hormone independent bilateral adrenocortical macronodular hyperplasia as a distinct subtype of Cushing-syndrome - enzyme histochemical and ultrastructural-study of 4 cases with a review of the literature. *Am J Clin Pathol.* 1991;96(3):334-40.
64. Sasano H, Imatani A, Shizawa S, Suzuki T, Nagura H. Cell proliferation and apoptosis in normal and pathologic human adrenal. *Mod Pathol.* 1995;8(1):11-7.
65. Margioris AN, Chrousos GP. Adrenal Disorders: Humana; Softcover reprint of hardcover. 1<sup>st</sup> ed. 2001 edição (9 novembro 2010); 2010.
66. Reddy GP. Cell cycle: regulatory events in G1-->S transition of mammalian cells. *J Cell Biochem.* 1994;54(4):379-86.
67. 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.

68. Cavalcante IP, Berthon A, Fragoso MC, Reincke M, Stratakis CA, Ragazzon B, et al. Primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia: definitely a genetic disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2022 Aug 3. doi: 10.1038/s41574-022-00718-y. *Epub ahead of print*.
69. Fogt F, Vortmeyer AO, Poremba C, Minda M, Harris CA, Tomaszewski JE. bcl-2 expression in normal adrenal glands and in adrenal neoplasms. *Mod Pathol*. 1998;11(8):716-20.
70. Bernini GP, Moretti A, Viacava P, Bonadio AG, Iaconi P, Miccoli P, et al. Apoptosis control and proliferation marker in human normal and neoplastic adrenocortical tissues. *Br J Cancer*. 2002;86(10):1561-5.
71. Zhang PJ, Genega EM, Tomaszewski JE, Pasha TL, LiVolsi VA. The role of calretinin, inhibin, melan-A, BCL-2, and C-kit in differentiating adrenal cortical and medullary tumors: an immunohistochemical study. *Mod Pathol*. 2003;16(6):591-7.
72. Kanauchi H, Wada N, Clark OH, Duh QY. Apoptosis regulating genes, bcl-2 and bax, and human telomerase reverse transcriptase messenger RNA expression in adrenal tumors: possible diagnostic and prognostic importance. *Surgery*. 2002;132(6):1021-6; discussion 6-7.
73. 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.

74. Suda T, Tomori N, Tozawa F, Demura H, Shizume K, Mouri T, et al. Immunoreactive corticotropin and corticotropin-releasing factor in human hypothalamus, adrenal, lung cancer, and pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984;58(5):919-24.
75. Ehrhart-Bornstein M, Haidan A, Alesci S, Bornstein SR. Neurotransmitters and neuropeptides in the differential regulation of steroidogenesis in adrenocortical-chromaffin co-cultures. *Endocr Res.* 2000;26(4):833-42.
76. Vrezas I, Willenberg HS, Mansmann G, Hiroi N, Fritzen R, Bornstein SR. Ectopic adrenocorticotropin (ACTH) and corticotropin-releasing hormone (CRH) production in the adrenal gland: basic and clinical aspects. *Microsc Res Tech.* 2003;61(3):308-14.
77. Ballav C, Naziat A, Mihai R, Karavitaki N, Ansorge O, Grossman AB. Mini-review: pheochromocytomas causing the ectopic ACTH syndrome. *Endocrine.* 2012;42(1):69-73.
78. Oh HC, Koh JM, Kim MS, Park JY, Shong YK, Lee KU, et al. A case of ACTH-producing pheochromocytoma associated with pregnancy. *Endocr J.* 2003;50(6):739-44.
79. Cohade C, Broussaud S, Louiset E, Bennet A, Huyghe E, Caron P. Ectopic Cushing's syndrome due to a pheochromocytoma: a new case in the post-partum and review of literature. *Gynecol Endocrinol.* 2009;25(9):624-7.

80. Pereira MAA, Araujo RS, Bisi H. Síndrome de Cushing associada à hiperplasia macronodular das adrenais: apresentação de um caso e revisão da literatura. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2001;45:619-27.
81. Hiroi N, Chrousos GP, Kohn B, Lafferty A, Abu-Asab M, Bonat S, et al. Adrenocortical-pituitary hybrid tumor causing Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(6):2631-7.
82. Louiset E, Duparc C, Young J, Renouf S, Nomigni MT, Boutelet I, et al. Intraadrenal corticotropin in bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *N Engl J Med.* 2013;369(22):2115-25.
83. Lamberts SW, Bons EG, Bruining HA. Different sensitivity to adrenocorticotropin of dispersed adrenocortical cells from patients with Cushing's disease with macronodular and diffuse adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984;58(6):1106-10.
84. Bland ML, Desclozeaux M, Ingraham HA. Tissue growth and remodeling of the embryonic and adult adrenal gland. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;995:59-72.
85. Ulrich-Lai YM, Engeland WC. Hyperinnervation during adrenal regeneration influences the rate of functional recovery. *Neuroendocrinology.* 2000;71(2):107-23.
86. Engeland WC, Levay-Young BK. Changes in the glomerulosa cell phenotype during adrenal regeneration in rats. *Am J Physiol.* 1999;276(5):R1374-82.

87. Wilkinson CW, Shinsako J, Dallman MF. Return of pituitary-adrenal function after adrenal enucleation or transplantation: diurnal rhythms and responses to ether. *Endocrinology*. 1981;109(1):162-9.
88. Dallman MF, Engeland WC, McBride MH. The neural regulation of compensatory adrenal growth. *Ann N Y Acad Sci*. 1977;297:373-92.
89. Gill GN, Weidman ER. Hormonal regulation of initiation of DNA synthesis and of differentiated function in Y-1 adrenal cortical cells. *J Cell Physiol*. 1977;92(1):65-75.
90. Kimura E, Sonobe MH, Armelin MC, Armelin HA. Induction of FOS and JUN proteins by adrenocorticotropin and phorbol ester but not by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate derivatives. *Mol Endocrinol*. 1993;7(11):1463-71.
91. Mete O, Erickson LA, Juhlin CC, de Krijger RR, Sasano H, Volante M, et al. Overview of the 2022 WHO Classification of Adrenal Cortical Tumors. *Endocr Pathol*. 2022;33(1):155-96.
92. Erickson L. Adrenocortical nodular disease. *In*: Krijger RRd (editor). WHO Classification of Tumours Editorial Board Endocrine and Neuroendocrine tumours [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2022.