

Hiperplasia Adrenal Macronodular Independente de ACTH (AIMAH) – Aspectos Clínicos e Moleculares

*Sonir R. Antonini
Maria Cândida Fragoso
André Lacroix*

*Disciplina de Endocrinologia
Pediátrica (SRA), Departamento
de Pediatria, Hospital das
Clínicas da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto -
USP; Laboratório de Hormônios e
Genética Molecular - LIM/42
(MCF), Disciplina de
Endocrinologia, Departamento de
Clínica Médica, HC-FMUSP; e
Laboratory of Endocrine
Pathophysiology (AL), Division of
Endocrinology, Department of
Medicine, Research Centre, Hôtel-
Dieu du Centre Hospitalier de
l'Université de Montréal
(CHUM), Canada.*

*Recebido em 13/07/04
Aceito em 20/07/04*

RESUMO

A AIMAH é caracterizada pela presença de macronódulos em ambas as adrenais, na ausência da estimulação do ACTH. Habitualmente, as manifestações clínicas aparecem somente após várias décadas de vida, provavelmente em função da baixa atividade esteroidogênica do tecido hiperplásico. Entretanto, em indivíduos assintomáticos cuja AIMAH foi descoberta acidentalmente, o eixo HHA já se encontra alterado. Estudos têm demonstrado que, na maioria dos casos de AIMAH, a secreção de cortisol é regulada de modo “aberrante” por hormônios como o GIP, AVP, catecolaminas, LH/hCG e serotonina, através de seus respectivos receptores, ectópicos ou eutópicos, porém aberrantemente acoplados à esteroidogênese. Os mecanismos moleculares responsáveis pela expressão ectópica dos receptores hormonais e/ou de seu acoplamento anormal à esteroidogênese adrenal ainda são pouco conhecidos. Embora a expressão aberrante destes receptores hormonais possa desempenhar um papel importante na iniciação da proliferação celular aumentada, bem como na esteroidogênese, é provável que eventos genéticos adicionais ocorram, envolvendo a regulação do ciclo celular, adesão e transcrição. Mutações no gene *GNAS1* não associadas à síndrome de McCune-Albright podem ser encontradas em raros casos de AIMAH. Em alguns casos, a presença de receptor hormonal aberrante abre novas possibilidades de tratamento farmacológico específico do hipercortisolismo, seja isolado ou associado à adrenalectomia unilateral. **(Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/5:620-636)**

Descritores: Síndrome de Cushing; Hiperplasia adrenal macronodular; Receptores adrenais;

ABSTRACT

Clinical and Molecular Aspects of the ACTH-Independent Bilateral Macronodular Adrenal Hyperplasia.

AIMAH is a clinical condition characterized by the presence of adrenal macronodules even in the absence of ACTH. Usually the clinical overt syndrome only becomes apparent after several decades of life; this is probably due to the low steroidogenic enzyme capacity of the hyperplastic tissue. However, in asymptomatic individuals in whom the AIMAH was incidentally discovered, the HHA axis is usually disrupted. In the great majority of AIMAH cases, cortisol secretion is aberrantly regulated by hormones such as GIP, AVP, cateadrenergic agonists, LH/hCG and in some cases by serotonin, acting through their specific receptors. The molecular mechanisms responsible by ectopic expression of such hormone receptors and/or their aberrant coupling to steroidogenesis are still largely unknown. Although this aberrant expression may have an important role in the augmented cell proliferation initiation, as well as in the steroidogenesis, it is probable that additional genetic events involving cell cycle regulation, adhesion and transcription occur. In rare cases *GNAS1* mutations not related to McCune-Albright syndrome may

be found in this condition. In some patients, the presence of aberrant hormone receptors creates the possibility of specific pharmacological treatment, isolated or associated with unilateral adrenalectomy. (Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/5:620-636)

Keywords: Cushing's syndrome; Macronodular adrenal hyperplasia; Adrenal receptors;

EM 1934, DOIS ANOS APÓS Harvey Cushing ter descrito a associação entre a presença de adenomas basofílicos hipofisários com a síndrome clínica que mais tarde levaria seu nome, Walters e cols. descreveram pacientes com o mesmo quadro clínico causado por alterações primárias das adrenais (1). De acordo com sua origem, a síndrome de Cushing (SC) de causa endógena pode ser dividida em duas classes: dependente e independente de ACTH. Dentre as causas de SC independente de ACTH, ou doença primária das adrenais, as lesões unilaterais (adenomas e adenocarcinomas) são mais freqüentes e correspondem a mais de 90-95% dos casos. As lesões bilaterais são bem menos comuns e incluem a doença nodular pigmentada das adrenais (PPNAD – *primary pigmented nodular adrenal disease*), a hiperplasia macronodular bilateral primária das adrenais (AIMAH – *ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia*) e, mais raramente ainda, adenomas bilaterais.

HIPERPLASIA MACRONODULAR BILATERAL PRIMÁRIA DAS ADRENAIS - AIMAH

A AIMAH começou a ser melhor caracterizada somente no final de década de 80, sendo que no início existia alguma confusão entre a hiperplasia adrenal encontrada na doença de Cushing e a verdadeira AIMAH. Embora a ocorrência de hiperplasia adrenal bilateral com a presença de macronódulos secundária à hiperestimulação crônica feita pelo ACTH seja comum na doença de Cushing, a AIMAH é uma entidade distinta, caracterizada pelo aumento bilateral das adrenais, na ausência do estímulo exercido pelo ACTH.

Na AIMAH ocorre a formação de grandes nódulos de coloração amarelada com mais de 5mm de diâmetro, chegando a atingir vários centímetros (figura 1). Até há alguns anos acreditava-se que inicialmente estes macronódulos adrenais fossem decorrentes do estímulo do ACTH e que, no decorrer do processo, tornavam-se autônomos. Hoje, embora não se conheça exatamente o mecanismo iniciador deste

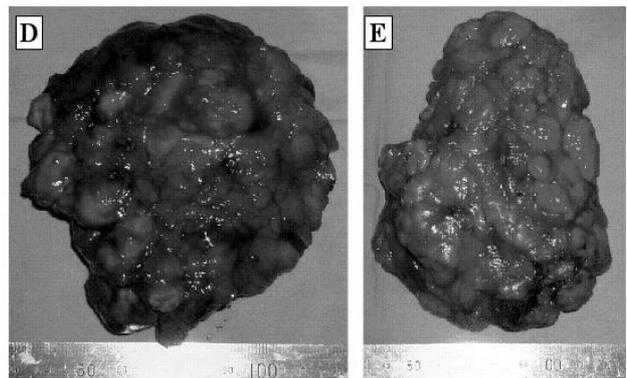


Figura 1. AIMAH: macroscopia – hiperplasia adrenal bilateral com a presença de numerosos macronódulos de coloração amarelada, com tamanho variado, atingindo até vários centímetros de diâmetro. D – adrenal direita e E – adrenal esquerda.

processo, acredita-se que estes tecidos sejam autônomos desde o princípio.

Na maior parte dos casos relatados, a expressão clínica ocorreu após a quinta ou sexta década de vida, entretanto alguns poucos casos tem sido relatados em pacientes antes da terceira década. Nos casos de AIMAH descobertos acidentalmente (incidentalomas), nenhum paciente apresentava as características clínicas da SC, porém a avaliação laboratorial já evidenciava anormalidades, como valores de cortisol plasmático elevados às 23 horas, supressão incompleta do cortisol após dexametasona e ACTH plasmático parcialmente supresso (2). Estudos demonstraram que a produção de cortisol na AIMAH é baixa e que é necessário um aumento significativo no número de células para que a SC torne-se clinicamente aparente. O achado da expressão diferencial das enzimas 3 β -HSD e P450c17 entre as células componentes dos macronódulos explica, pelo menos em parte, este fenômeno (3). Estudando a expressão de vários genes codificadores de enzimas esteroidogênicas em uma série de AIMAH, verificamos uma redução bastante significativa na expressão destes genes quando comparada à expressão encontrada na adrenal normal, corroborando a hipótese da baixa eficiência esteroidogênica destes tecidos (4).

Ao contrário do que se observa nas outras causas de SC, não existe a predominância do sexo feminino. A maioria dos casos é esporádica, entretanto, alguns casos familiares foram relatados (5).

Alterações Laboratoriais na AIMAH

Laboratorialmente, a SC causada pela AIMAH apresenta praticamente as mesmas características laboratoriais encontradas nas outras doenças primárias das

adrenais: ausência de ritmo circadiano, cortisol plasmático e urinário elevados e ausência de supressão significativa do cortisol após a administração de doses elevadas de dexametasona. O ACTH plasmático encontra-se, na maioria dos casos, indetectável tanto no basal quanto após estímulo com o CRH. Entretanto, algumas peculiaridades laboratoriais podem ser encontradas em alguns casos, como no caso da SC dependente de alimentação, na qual o cortisol encontra-se muito baixo pela manhã (em jejum), aumentando após a alimentação. Outro achado interessante é o da presença de resposta, ao menos parcial, do cortisol ao estímulo com ACTH. De maneira diferente ao que se observa na SC causada por outras lesões adrenais, muitos pacientes respondem, pelo menos parcialmente, ao estímulo com ACTH; isto pode ser explicado pela expressão reduzida, porém presente, do receptor do ACTH (ACTHR) nestes tecidos (6).

Imagem

Do ponto de vista radiológico, a tomografia computadorizada ou a ressonância magnética evidenciam o aumento maciço de ambas as adrenais, com a presença de múltiplos nódulos de tamanho variado, alguns atingindo até 5cm de diâmetro (figura 2). Não é rara a presença de assimetria importante entre as duas adrenais. A grande maioria destes nódulos capta iodocolesterol. Em comparação com as adrenais normais, cujo peso (combinado) varia de 8 a 12 gramas, estas adrenais apresentam peso variando desde várias dezenas até centenas de gramas. Na hiperplasia adrenal secundária à doença de Cushing o aumento é relativamente discreto, sendo que o peso total de ambas as adrenais raramente ultrapassa 30 gramas (7,8).

Anátomo-patológico

O exame macroscópico demonstra a presença de múltiplos nódulos adrenais de coloração amarelada. Existem algumas controvérsias em relação ao exame histopatológico na AIMAH, principalmente em relação ao *status* do córtex internodular, por isto o aspecto da região internodular não é considerado um critério específico no diagnóstico. O exame microscópico revela a presença de múltiplos nódulos de hiperplasia cortical compostos por células da zona fasciculada, todos com aspecto homogêneo, constituídos predominantemente por dois tipos celulares característicos: células grandes e pequenas com citoplasma claro, escassez de figuras mitóticas, não existindo áreas necróticas. Células adiposas também são encontradas dentro destes nódulos. Estudos utilizando hibridização *in situ* demonstraram uma expressão diferencial

entre as enzimas envolvidas na esteroidogênese; a expressão do CYP17 predomina nas células pequenas enquanto que o gene da 3 α -HSD é expresso exclusivamente nas células claras grandes. Esta expressão diferencial ocorre exclusivamente na AIMAH (9). Como citado anteriormente, o aspecto da região internodular é controverso, alguns autores relatam atrofia enquanto que outros relatam um córtex de aspecto normal (7,10,11). Uma fina camada de células da camada glomerulosa está habitualmente presente, porém, não se observam células da camada reticular.

REGULAÇÃO ANORMAL POR RECEPTORES HORMONAIS "ILÍCITOS" NA AIMAH

O conceito de receptores hormonais ilícitos, ectópicos ou aberrantes, expressos nas adrenais foi proposto pela primeira vez pelo grupo de Robert Ney em 1971 (12). Estudando, *in vitro*, células provenientes de carcinoma adrenal produtor de corticosterona de rato (linhagem celular 494), estes autores verificaram que, além do ACTH, outros hormônios como catecolaminas e TSH eram capazes de estimular a adenilciclase. Em células adrenais normais, este efeito não podia ser detectado (12,13). A ação das catecolaminas ocorria através da interação específica com os receptores α -adrenérgicos. Posteriormente, outros grupos de pesquisa, estudando esta mesma linhagem celular, demonstraram que outros hormônios como FSH, LH, AVP, glucagon, insulina, PTH e calcitonina, através de seus receptores específicos, eram capazes de estimular a adenilciclase.

Em 1974, Hingshaw e Ney (13) demonstraram pela primeira vez a modulação da adenilciclase por outros hormônios que não o ACTH em adenomas e adenocarcinomas adrenais humanos. Posteriormente, através de estudos *in vitro*, foi sendo caracterizado o acoplamento funcional de outros receptores hormonais de membrana, a maioria ligada à proteína G, em tumores adrenocorticais, como os receptores do LH, FSH, TSH, α -adrenérgicos, prolactina, angiotensina, glucagon, interleucina e hormônio lactogênio-placentário (5).

Somente em 1987 o conceito de receptores hormonais aberrantes começa a ganhar significação clínica com a descrição original de um paciente canadense com SC associada à alimentação (14). Cinco anos mais tarde, este mesmo grupo (15) e um grupo francês (16), estudando novos casos de SC ligada à alimentação, conseguem comprovar que a produção anormal de cortisol nestes pacientes era induzida por um hormônio gastrointestinal, o GIP (peptídeo

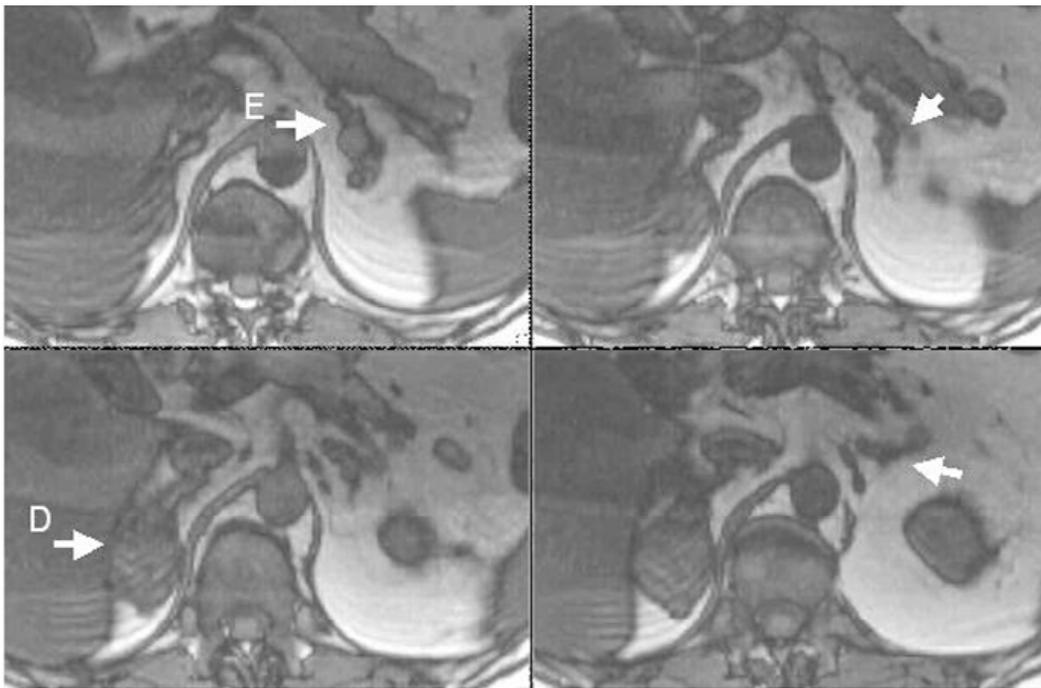


Figura 2. Corte de RM, axial, pesado em T1, fora de fase. As setas indicam as adrenais hiperplasiadas e compostas por múltiplos macronódulos, de tamanho variado. E - adrenal esquerda; D - adrenal direita.

insulinotrópico dependente de glicose ou peptídeo inibitório gástrico). O estudo destes casos foi inovador, ao descrever uma nova causa de SC, reconhecendo pela primeira vez a possibilidade de ocorrência de doenças do córtex adrenal na espécie humana associada à estimulação cortical por outros hormônios que não o ACTH.

SC Dependente de Alimentação ou Dependente de GIP

O primeiro caso de SC dependente de alimentação foi descrito em um homem de 41 anos com SC, que apresentava uma hipersecreção de cortisol, de caráter periódico, causada por um adenoma adrenocortical unilateral. Neste paciente, o cortisol plasmático era surpreendentemente muito baixo pela manhã, porém elevava-se após as refeições e sua secreção não era suprimida pela dexametasona, mesmo em doses elevadas. O estímulo com ACTH promovia um aumento discreto na produção de cortisol (14).

Cinco anos mais tarde, 2 estudos *in vivo* e *in vitro*, em pacientes apresentando SC causada por AIMAH, aprofundaram o conhecimento desta nova condição (15,16). Estes pacientes apresentavam um perfil de secreção de cortisol semelhante ao caso descrito anteriormente e que caracteriza tipicamente estes pacientes,

isto é, cortisol plasmático muito baixo pela manhã (em jejum) inclusive com sinais/sintomas leves de insuficiência adrenal e elevação do cortisol após a alimentação. Nestes casos, a produção de cortisol era estimulada pela ingestão oral de glicose e lipídios e em menor extensão por proteínas, mas não ocorria após a infusão endovenosa de glicose, caracterizando o envolvimento do trato gastrointestinal nesta condição. A infusão endovenosa de somatostatina era capaz de prevenir a hipersecreção de cortisol após o estímulo alimentar.

O possível envolvimento dos hormônios GIP e o GLP-1 (peptídeo *glucagon-like 1*) na gênese da SC nestes pacientes foi então sugerido. A comprovação definitiva da relação entre o GIP e o hipercortisolismo nestes casos foi realizada através da demonstração de que a infusão endovenosa de GIP era capaz de provocar liberação de cortisol nestes pacientes, mas não em indivíduos normais. Além disto foi demonstrado o acúmulo de [¹²³I]-GIP nas adrenais hiperplasiadas destes pacientes, mas não em indivíduos normais. Nestes pacientes, a administração de octreotida, devido à sua capacidade de inibir a secreção de GIP, resultou em melhora temporária do quadro clínico, com normalização do cortisol urinário durante 5 meses, sendo necessário tratamento cirúrgico (15).

Após a cirurgia, estudos *in vitro* demonstraram

a capacidade do GIP em estimular a produção de cortisol nestas células, fenômeno não verificado em células adrenais normais (15,16). Até o momento, cerca de 30 casos de hipersecreção adrenal associada ao GIP foram descritos na literatura, a maioria em casos de AIMAH, entretanto esta situação ocorre em alguns casos de SC causada por adenomas unilaterais e também associada à hipersecreção de andrógenos (17).

A hipótese de que esta "sensibilidade" adrenal anormal ao GIP seria secundária à expressão ectópica ou de mutações ativadoras do gene GIPR nas adrenais destes pacientes foi então inicialmente proposta. Após a clonagem do gene do GIPR humano (18,19), foi possível demonstrar a superexpressão do gene do GIPR nas adrenais dos pacientes com SC dependente de GIP (AIMAH e adenomas) quando comparada a adrenais normais ou de pacientes com SC de outra etiologia, onde muito pouco mRNA do gene GIPR pode ser encontrado, entretanto, nestes casos, o GIPR não está acoplado à esteroidogênese (20-22).

O GIP é um peptídeo composto por 42 aminoácidos e é secretado pelas células K do duodeno e intestino delgado em resposta à absorção de glicose, lipídios e, em menor extensão, proteínas (23). O GIP e o GLP-1 são os responsáveis pela estimulação da secreção de insulina induzida pela glicose (24,25). O GIP exerce seu efeito através da ligação a seu receptor específico, o GIPR (26), que é expresso em vários tecidos humanos. Em adição ao seu efeito insulínico já bem caracterizado, o GIP via GIPR possui outros efeitos fisiológicos, como a regulação da secreção de ácidos no estômago, regulação da circulação esplâncnica, estimulação da lipogênese em adipócitos e modulação da função dos osteoblastos (27-29). Por outro lado, investiga-se a possibilidade de a presença de anormalidades no GIP-GIPR estar envolvida na etiopatogênese de doenças como *diabetes mellitus* tipo 2 e obesidade (30-32).

Os mecanismos moleculares envolvidos na expressão aberrante do GIPR, bem como dos outros receptores hormonais ocasionalmente envolvidos na SC, ainda não estão esclarecidos. Acredita-se que nos casos de AIMAH, o evento responsável ocorre no início da vida embrionária, justificando a ocorrência simultânea de vários nódulos em ambas as adrenais, com caráter policlonal. Por outro lado, nos casos dos adenomas com expressão/função aberrante de receptores hormonais, o evento mutacional deve ocorrer no período pós-zigótico, pois estes adenomas são monoclonais e o tecido adrenal subjacente e a adrenal contra-lateral estão atrofiados e não apresentam expressão do receptor aberrante envolvido (5).

A hipótese de que mutações ativadoras na

região codificadora do gene do GIPR seriam a causa de sua expressão anormal não foi confirmada nos poucos casos estudados (21). A possibilidade de que polimorfismos, mutações ou rearranjos na região promotora do gene do GIPR levariam à expressão aberrante deste gene nos tecidos adrenais afetados também foi afastada após seqüenciamento completo de cerca de 10.000 pares de bases da região regulatória do gene GIPR (33). Assim, os mecanismos moleculares responsáveis pela expressão anormal do GIPR, bem como de seu acoplamento à esteroidogênese adrenal na SC dependente de GIP, ainda não são conhecidos.

SC Responsiva à Vasopressina

Na SC de causa adrenal, onde o ACTH encontra-se supresso, a administração de lisina vasopressina (LVP) não provoca aumento da secreção de cortisol, contrário ao que se observa na doença de Cushing, onde o estímulo com LVP leva à liberação de ACTH e, conseqüentemente, de cortisol.

A estimulação anormal da secreção de cortisol em resposta à administração de AVP ou LVP tem sido relatada em alguns pacientes com SC ACTH-independente secundária a adenoma ou AIMAH desde a década de 70 (34-37). Esta resposta anormal é mediada pelo receptor AVPR-V1a, porém, contrário ao que ocorre na SC dependente de GIP, a expressão deste gene não difere daquela encontrada na adrenal normal (36,37). A diferença nestes casos é que o estímulo exógeno com AVP estimula a secreção de cortisol nestes tecidos. A hipótese etiológica desta síndrome é de que ocorre uma ativação anormal, isto é, um acoplamento anormal à esteroidogênese adrenal destes receptores originalmente eutópicos na adrenal, não se tratando, portanto, de expressão ectópica ou de superexpressão.

É importante observar-se que a administração de doses farmacológicas de AVP pode aumentar a secreção de catecolaminas (38) e indiretamente estimular a secreção de cortisol, como acontece nos casos de SC dependente de catecolaminas (39). Portanto, é fundamental a demonstração de que, nos casos suspeitos de SC dependente de AVP, a produção de cortisol é modulada pelo AVP endógeno.

Um caso típico de SC dependente de AVP foi descrito pelo grupo canadense em uma mulher de 36 anos que apresentava a associação incomum de SC causada por AIMAH e hipotensão postural (39). Nesta paciente, a administração de AVP, mas não de DDAVP, provocava liberação de cortisol e de aldosterona. No teste postural, ocorria hipotensão e aumento significativo do cortisol e da aldosterona, mesmo com o ACTH e a renina estando supressos. Durante o teste endovenoso

de supressão com dexametasona, o estímulo com AVP levava à produção de cortisol, aldosterona e de andrógenos nesta paciente, mas não em indivíduos normais. Após a cirurgia, o estudo *in vitro* de células adrenais desta paciente comprovou a modulação da secreção de cortisol pelo AVP, especificamente através de receptores V1. O estudo molecular evidenciou uma expressão do AVPR neste tecido em quantidade semelhante à de tecidos adrenais normais; além disto, o estudo de ligação também demonstrou uma afinidade semelhante. O estudo do gene do AVPR também não evidenciou a presença de mutações (40). Portanto, semelhante à SC dependente de GIP, ainda não se conhece o mecanismo pelo qual o sistema AVP-AVPR controla a esteroidogênese nestes casos. A relação causal entre esta resposta anormal ao AVPR e a hipotensão postural nesta paciente permanece inexplicada.

SC Dependente de Catecolaminas

A presença de receptores α -adrenérgicos ectópicos funcionalmente acoplados à esteroidogênese em tumores adrenais já havia sido demonstrada *in vitro* desde a década de 80 (41,42), entretanto, a expressão clínica desta anormalidade só foi comprovada em 1997 (39), em um paciente de 56 anos com SC causada por AIMAH, cuja secreção de cortisol correlacionava-se perfeitamente com as variações fisiológicas das catecolaminas endógenas. Neste paciente, bem como no segundo paciente descrito nesta situação (43), ocorria o aumento significativo na secreção de cortisol, que era independente do ACTH e concomitante ao aumento das catecolaminas (teste postural, hipoglicemia insulínica, estresse induzido pelo exercício). Este aumento do cortisol também ocorria após a administração de α -agonistas e era bloqueado pela administração de α -bloqueadores. O possível efeito do sistema renina-angiotensina, bem como do AVP, foi descartado através de testes com seus respectivos agonistas e antagonistas. Neste paciente, o tratamento com doses elevadas de um antagonista α -adrenérgico, o propranolol, foi capaz de controlar clínica e laboratorialmente a hipersecreção de cortisol por vários meses. Após, houve piora clínica e uma adrenalectomia unilateral foi realizada, entretanto, o tratamento adjuvante com propranolol permitiu o controle do hiper-cortisolismo, mesmo com a manutenção de uma das adrenais hiperplasiadas.

A análise molecular evidenciou a presença de receptores adrenérgicos de alta afinidade do tipo α_1 ou α_2 no tecido adrenal do primeiro paciente descrito e a comprovação de seu acoplamento à esteroidogênese, pela demonstração da estimulação da adenil-ciclase

após o estímulo com α -agonista, *in vitro*. No córtex adrenal normal, os receptores α_1 - ou α_2 -adrenérgicos não são expressos. O subtipo específico do receptor α -adrenérgico envolvido e a presença de possíveis mutações neste gene ectopicamente expresso na adrenal ainda não foram completamente estudados.

SC Dependente de Gonadotrofinas (LH/hCG)

Em condições fisiológicas, o LH estimula a esteroidogênese gonadal através da adenilciclase. O receptor LH/hCG é expresso principalmente nos tecidos gonadais, mas também no útero, placenta, cérebro e próstata (44). Através de técnicas como a hibridização *in situ* e a imuno-histoquímica, pequena quantidade do LH/hCGR pode ser detectada na camada reticular do córtex adrenal normal. No feto, o hCG estimula a secreção de DHEAS (45), entretanto, este efeito não ocorre em indivíduos adultos.

Um outro exemplo de receptor hormonal aberrante na AIMAH foi originalmente relatado em uma paciente canadense de 63 anos que apresentava uma SC causada por AIMAH, cujo quadro clínico apareceu claramente cerca de 10 anos após sua menopausa (46). Esta paciente apresentara, durante suas 4 gestações, ganho de peso excessivo (18-22kg) e aspecto cushingóide, porém, sem outros sinais característicos de SC, como hipertensão arterial, estrias violáceas ou hirsutismo. Após o parto, o peso retornava rapidamente ao normal, porém ela apresentava fadiga importante, náuseas e hiporexia, sugerindo uma insuficiência adrenal. Na investigação laboratorial aos 63 anos, a administração de GnRH, hCG ou LH, mas não do FSH, provocavam aumento significativo na secreção de cortisol, testosterona livre e DHEAS. Além disto, a administração de cisaprida e metoclopramida, agonistas serotoninérgicos (5-HT₄R) também provocava elevação destes hormônios. Nesta paciente, o tratamento crônico com agonista do GnRH (acetato de leuprolida) promoveu a normalização da secreção de cortisol, paralelamente à redução da secreção de LH. Esta paciente apresentou melhora clínica e laboratorial da SC e não necessitou de tratamento cirúrgico, mantendo o hiper-cortisolismo controlado por período prolongado de tempo. Posteriormente, investigando casos de incidentomas adrenais, um outro caso de secreção anormal de cortisol estimulada pelo LH e pela hCG foi descrito em uma paciente com AIMAH que se apresentava clinicamente normal, com excreção urinária de cortisol normal, porém, sem supressão do cortisol após administração de dexametasona (2). Este achado corrobora a hipótese de que vários receptores hormonais "ilícitos"

podem estar presentes na fase pré-clínica da AIMAH, como bem demonstrado na análise de vários pacientes com AIMAH, porém clinicamente normais (2). O mecanismo molecular desta localização/ação anormal do receptor de hCG/LH nos casos de SC dependente de LH ainda não foi elucidado. Acredita-se que ocorra a expressão ectópica deste receptor nos tecidos afetados, porém ainda não foi possível o estudo *in vitro* em casos de AIMAH dependente de LH, porém recentemente foi descrita a expressão ectópica do hCG/LHR em um adenocarcinoma adrenal de paciente com SC associada a gravidez (47).

A ocorrência de SC associada ou exacerbada pela gravidez, que apresenta melhora clínica (parcial ou total) e laboratorial após o parto, tem sido relatada em várias pacientes com adenomas unilaterais ou AIMAH (5); nestes casos, é possível que o receptor LH/hCGR tenha se expressado e acoplado ilicitamente a esteroidogênese adrenal por estes tecidos anormais. É importante ressaltar que a ocorrência de remissão espontânea da SC após o parto tem sido relatada também em alguns casos de SC dependente de ACTH (48).

Vários relatos clínicos de tumores adrenais secretores unicamente de andrógenos que apresentam resposta ao estímulo com hCG ou GnRH têm sido publicados (49,50), entretanto, na maioria destes poucos casos relatados, o LH encontrava-se relativamente supresso, portanto, o papel do LH endógeno na manutenção da hipersecreção hormonal nestes casos é incerto. Especulações sobre a possível origem gonadal destas células adrenais anormais foram feitas, entretanto, existem evidências clínicas definitivas sobre a origem adrenal em vários destes casos (50).

SC Responsiva a Serotonina

Na espécie humana, a serotonina (5-HT) e os agonistas serotoninérgicos, através de mecanismo parácrino, são potentes estimuladores da secreção de aldosterona e em menor intensidade de cortisol (51). Este efeito está relacionado à expressão do receptor da serotonina (5-HT₄R), principalmente na zona glomerulosa e fracamente na zona fasciculada (52). Em vários pacientes com SC causado por AIMAH, uma resposta exagerada na produção de cortisol após estímulo com cisaprida ou metoclopramida (agentes serotoninérgicos) tem sido relatada (2,53,54). A presença do receptor 5-HT₄R nestes tecidos adrenais anormais foi demonstrada (54). Recentemente Manelli e cols. (2003) (55) relataram um paciente com SC causada por AIMAH no qual, através dos testes *in vivo* empregados na triagem da presença de receptores anormais regulando a hipersecreção de corti-

sol (53), verificaram uma resposta anormal a cisaprida. Após a cirurgia (adrenalectomia unilateral com a exérese do nódulo preponderante), o estudo *in vitro* destas células confirmou a ação da cisaprida em estimular a secreção de cortisol. Através do uso da técnica de PCR em tempo real, estes autores demonstraram a expressão das isoformas c, g e n do receptor 5-HT₄ em quantidades maiores do que a observada em tecidos adrenais normais. Analisando tecidos adrenais provenientes de uma série de pacientes com SC causada por AIMAH que apresentavam hipersecreção de cortisol após estímulo com cisaprida, Cartier e cols. (2003) (56) encontraram uma superexpressão do 5-HT₄R na maioria, mas não em todos os casos. O seqüenciamento do cDNA deste receptor demonstrou a ausência de mutações somáticas levando a ganho de função. Portanto, os mecanismos moleculares envolvidos nesta situação de superexpressão e/ou ação promíscua do receptor 5-HT₄R ainda não são conhecidos.

AIMAH ASSOCIADA A MUTAÇÕES ATIVADORAS DA SUB-UNIDADE ALFA DA PROTEÍNA GS

No início da década de setenta, foi sugerido por Martin Rodbell e cols. que uma série de hormônios atuava através de receptores específicos denominados de “discriminadores”, os quais estimulavam a adenilato-ciclase e amplificavam o sinal celular, num sistema denominado de “transdutor”. O “transdutor” comum a todos estes hormônios foi posteriormente caracterizado como sendo a família das proteínas ligadas ao nucleotídeo guanina, genericamente conhecidas como proteínas G (57,58).

Os receptores que transmitem o sinal celular via proteínas G possuem algumas características comuns em relação à sua estrutura. Apresentam uma região amino-terminal extracelular, uma região transmembrana com 7 domínios hidrofóbicos (α-hélices) ligados por 3 alças extracitoplasmáticas e 3 alças intracitoplasmáticas. Por apresentarem sete domínios transmembrana, são também conhecidos como receptores 7TM. Estes receptores formam a maior família de proteínas do organismo com mais de mil diferentes membros identificados, participando juntamente com as proteínas G de um sofisticado sistema de transdução do sinal celular (59-62). Existem inúmeros ligantes extracelulares que podem causar uma mudança na conformação do receptor, expondo as α-hélices e ativando as proteínas G, tais como: fóton de luz, odorantes, hormônios, neurotransmissores, nucleotídeos, proteases e íons. Os efetores celulares, regulados via proteínas G

são: adenilato-ciclase, as isoformas de fosfatidilinositol, fosfolipase C, fosfodiesterases dependentes de GMPc e canais iônicos (Na⁺, K⁺, Ca²⁺) (63).

Proteínas G - Classificação

As proteínas G fazem parte de uma superfamília com mais de 50 membros descritos e representam a chave intermediária do sinal celular dos receptores de membrana 7TM (64,65). Elas podem ser divididas em dois grupos, com base no seu peso molecular: um grupo de baixo peso molecular, entre 20 e 50kD, presente em todas as células eucariontes, melhor representada pela família do protooncogene *ras* e um grupo de alto peso molecular entre 80 e 90kD relacionado à transdução do sinal celular (65). Todas as proteínas G de alto peso molecular são heterotriméricas, constituindo-se de três polipeptídeos distintos: as sub-unidades α , β e γ em ordem decrescente de peso molecular. As sub-unidades α ligam-se ao nucleotídeo guanina com alta afinidade e especificidade, interagem com os receptores, com os efetores, com o complexo $\beta\gamma$ possuem atividade intrínseca GTPase (66-68).

As sub-unidades α são altamente conservadas entre os mamíferos, com mais de 95% de homologia, sendo as proteínas G classificadas de acordo com a seqüência estrutural e/ou homóloga funcional das sub-unidades α em quatro subfamílias: $G_s\alpha$, $G_q\alpha$, $G_i\alpha$, $G_{12}\alpha$ e cada subfamília é composta de vários membros. Na classe dos mamíferos, cerca de 16 genes codificam a sub-unidade α , e mais de 20 diferentes sub-unidades α já foram identificados. A sub-unidade α contém cinco regiões distintas altamente conservadas (G1-G5). G1, G4 e G5 são importantes para a ligação ao GTP enquanto G2 e G3 determinam a atividade GTPase. As sub-unidades β e γ são menos conservadas entre as espécies e estão fortemente associadas por ligação não covalente, formando um dímero funcional $\beta\gamma$ extremamente estável, entretanto cada sub-unidade do dímero também pode funcionar como um homodímero. Cerca de 6 genes codificam as sub-unidades β e 12 codificam as sub-unidades γ . O complexo $\beta\gamma$ quando associado à sub-unidade α , mantém a proteína G em seu estado heterotrimérico inativo (67-69).

Transdução do Sinal Celular dos Hormônios Que Utilizam os Receptores 7TM

A característica principal dos hormônios é sua habilidade em interagir com receptores altamente seletivos localizados na superfície ou no interior das células, cuja função é modificar o funcionamento ou o comportamento das células-alvo. Os receptores possuem alta afinidade e especificidade pelo seu ligante (hormônio), o que previne reações biológicas não específicas dos

hormônios. Os hormônios ativam uma série de eventos moleculares no interior das células, induzindo alteração da transcrição gênica e resultando numa resposta fisiológica. Transdução é o nome dado ao processo de ativação desses eventos intracelulares pelos estímulos externos. A primeira etapa do sinal celular é o acoplamento do ligante ao seu receptor. Os ligantes que podem ativar os receptores 7TM são diversos, variando desde pequenas moléculas (aminas biogênicas, odorantes), pequenos peptídeos (vasopressina), grandes peptídeos (paratormônio) e até grandes proteínas como os hormônios glicoprotéicos (70).

O mecanismo da transdução do sinal celular consiste de fosforilações e desfosforilações seqüenciais dos resíduos das proteínas intracelulares. Estes eventos de fosforilação e desfosforilação ocorrem após a ligação dos hormônios aos seus receptores de membrana 7TM, que vão ativar as proteínas G e gerar um segundo mensageiro, tais como AMPc, diacilglicerol ou íons cálcio (71,72).

O segundo mensageiro AMPc ativa a quinase protéica dependente de AMPc, resultando na fosforilação do substrato serina. A fosforilação consiste na transferência de um grupo fosfato a partir da adenosina trifosfato para resíduos específicos de aminoácidos, usualmente serina, mas algumas vezes também treonina ou tirosina. A fosforilação é determinada pela atividade das enzimas quinases protéicas, e a desfosforilação pelas fosfoproteínas fosfatases.

A quinase protéica dependente de AMPc consiste de quatro sub-unidades: duas sub-unidades catalíticas e um dímero regulatório, o qual se liga à molécula de AMPc. Desta forma, ocorre a dissociação da proteína quinase, sub-unidade regulatória da sub-unidade ativa catalítica. A sub-unidade ativa da proteína quinase catalisa a fosforilação de certas proteínas intracelulares (fatores de transcrição) que atuam na ativação e inativação gênica. O exato mecanismo pelo qual as proteínas fosforiladas ativam a transcrição gênica ainda não está bem estabelecido (73,74).

Ciclo GTPase

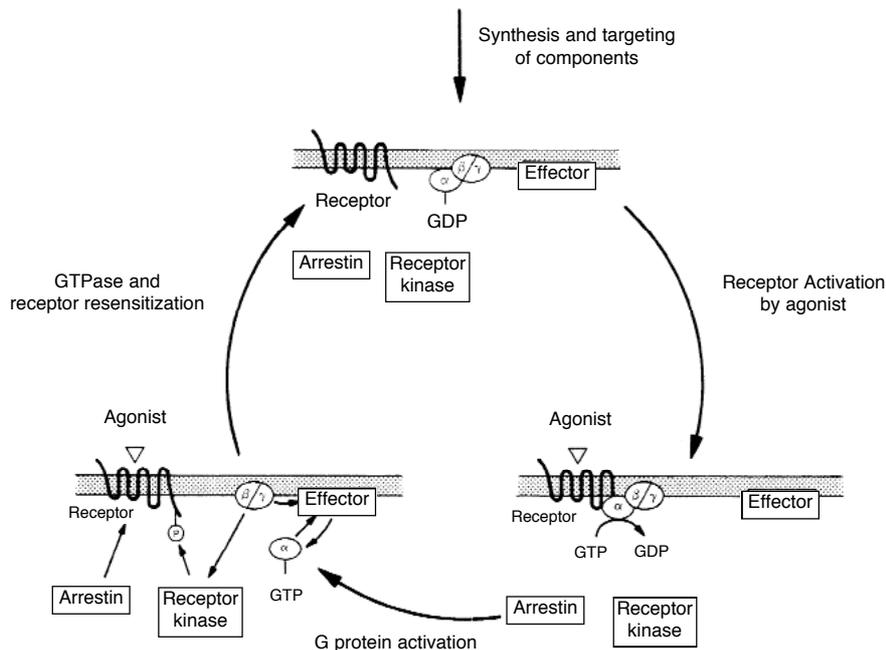
Todas as sub-unidades α possuem uma característica funcional comum que é a atividade GTPase, que determina o término do sinal celular. As proteínas G em seu estado inativo encontram-se na sua forma heterotrimérica ($\alpha\beta\gamma$) ligadas ao GDP. Quando o receptor é ativado por um ligante químico ou físico, ocorre uma alteração na sua conformação estrutural, expondo as α -hélices e sítios fundamentais para a ligação às proteínas G, o que acarreta uma mudança da conformação da sub-unidade α , diminuindo a sua afinidade pelo GDP.

A concentração molar intracelular do GTP é dez vezes mais elevada do que o GDP, ocorrendo sua substituição após a dissociação do GDP da sub-unidade β . Uma vez que o GTP está acoplado à sub-unidade α , esta assume sua conformação ativa, dissociando-se do receptor e do complexo $\beta\gamma$ e ligando-se, posteriormente, ao seu respectivo efetor, que irá desencadear a cascata de eventos intracelulares para ativar os mensageiros secundários, tais como o AMPc, o diaciglicerol e canais de cálcio. A atividade GTPase controla o término do sinal celular através da clivagem do α -fosfato terminal do GTP para GDP. Desta forma, a sub-unidade α se dissocia do efetor, liga-se novamente ao complexo $\beta\gamma$ e ao receptor. Assim, a proteína G assume sua forma heterotrimérica inativa, podendo receber um novo estímulo e reiniciar outro ciclo (figura 3). A atividade GTPase é um dos mecanismos que controla a duração da resposta celular. A razão de hidrólise do GTP é acelerada pela interação com certos efetores (adenilato-ciclase isoforma 5) ou com membros de uma nova família de proteínas,

RGS, conhecidas como reguladoras da atividade GTPase das proteínas Gi, Gq e G12 (*Regulator of G protein Signaling*) (75-77).

Efeito da Toxina da Bactéria *Vibrio cholerae* na Proteína G_s

As primeiras evidências de que uma ativação inapropriada da proteína G_s pudesse ter consequência patológica foram observadas em estudos com o *Vibrio cholerae*. A toxina colérica, secretada pelo *Vibrio cholerae* interage com as proteínas G_s e altera os níveis celulares de AMPc. A toxina colérica atua de forma irreversível a adenilato-ciclase nas células epiteliais do intestino, elevando os níveis de AMPc. Parte da toxina que é uma enzima penetra no citosol, onde catalisa a adição covalente do grupo adenosina difosfato-ribosil (ribosilação), proveniente do grupo nicotinamida adenina dinucleotídeo no aminoácido arginina (Arg²⁰¹) da proteína G_s , que é crítico para a atividade GTPase. Esta proteína alterada pode ativar a adenilato-ciclase normalmente, porém não pode hidrolisar GTP para GDP, ou seja, perde a atividade GTPase. A proteína G_s , permanece constitutivamente ativada, aumentando em 100 vezes ou mais os níveis de AMPc



Copyright © 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Figura 3. A ativação da proteína G inicia-se com a interação de um ligante endógeno com o seu receptor (R) de superfície celular 7TM. O receptor sofre uma alteração de sua conformação e torna-se ativo (R*), expondo sítios importantes para ligação com a proteína G. A ligação R*-proteína G favorece a troca da GDP pelo GTP com a sub-unidade G_α . G_α -GTP dissocia-se da $G_{\beta\gamma}$ e R*. Ambas as sub-unidades estão livres para modular a atividade de uma grande variedade de efetores intracelulares. O término do sinal ocorre quando o α -fosfato do GTP é hidrolizado a GDP pela atividade intrínseca GTPase. G_α -GDP então se re-associa ao complexo $G_{\beta\gamma}$ e o ciclo está completo. As proteínas RGS aceleram a atividade GTPase das sub-unidades G_α , desta forma reduzindo a duração dos eventos de sinalização (Cabrera-Vera e cols.).

nas células epiteliais do intestino. Desta forma, ocorre a passagem maciça de água do sangue para a luz intestinal, causando diarreia e desidratação (78).

Anormalidades na Transdução do Sinal Celular da Proteína G_sⓈ

Tem sido proposto que os genes que controlam a cascata de sinalização celular são possíveis alvos de mutação e podem levar ao desenvolvimento de doenças. Anormalidades na transdução do sinal celular podem ser devidas a alterações do receptor 7TM, da proteína G, ou de seus efetores.

Na última década, os avanços na biologia molecular possibilitaram a identificação de mutações no gene *GNAS1* (*Guanine Nucleotide Binding Alpha subunit 1*), que codifica a proteína G_sⓈ. As mutações ativadoras e inativadoras descritas estão associadas à alteração da transdução do sinal celular. Mutações da proteína G_sⓈ podem causar perda ou ganho de função por inativação ou ativação do sinal celular com apresentação clínica de excesso ou falta hormonal, respectivamente. A expressão fenotípica destas mutações depende se elas ocorrem nas células germinativas, afetando todas as células em que o gene é expresso, ou se elas ocorrem nas células somáticas, com manifestações focais da doença (tabela 1).

Mutações ativadoras descritas nos éxons 8 e 9 do gene *GNAS1* são somáticas, pontuais em heterozigose e alteram códons altamente conservados (Arginina²⁰¹ e Glutamina²²⁷), envolvidos na atividade GTPase. Estudos através de cristalografia e experimentos com mutagênese *in vitro* indicam que a arginina 201 e a glutamina 227 funcionam como um anel para estabilizar o Ⓢfosfato do GTP. Estas mutações denominadas *gps* (*G stimulatory protein*) levam a mudanças estruturais da proteína G_sⓈ,

diminuindo a hidrólise do Ⓢfosfato do GTP mantendo constitutivamente o sinal celular (79-85). As mutações inativadoras têm sido detectadas em todos os éxons do gene *GNAS1*, exceto o éxon 3, sendo 20% das mutações presentes no éxon 7. As mutações inativadoras são germinativas em heterozigose caracterizadas por pequenas deleções, inserções, mutações pontuais *missense* e *stop codon* prematuro. Ensaios bioquímicos que mediram a produção hormonal após a reconstituição de membranas de pacientes com pseudo-hipoparatiroidismo (PHPIa) que apresentam mutação inativadora da proteína G_sⓈ, demonstraram uma deficiência parcial da atividade da proteína G_sⓈ em vários tipos celulares, tais como: eritrócitos, fibroblastos, linfócitos e células renais. Estudos subseqüentes mostram decréscimo da expressão do RNA mensageiro e da proteína G_sⓈ (86).

Gene GNAS1

O gene *GNAS1* humano foi clonado em 1988 por Kosaza e cols.; com cerca de 20Kb, está localizado no braço longo do cromossomo 20 na região 13.1-13.2 (87).

Inicialmente, a seqüência de pares de base estava distribuída em 13 éxons com 4 *splicing* *GNAS1*. O seu homólogo em ratos (*Gnas*) apresenta alta complexidade com múltiplos *splicing* alternativos formando transcritos que codificam várias proteínas e transcritos não traduzidos. Utilizando promotores alternativos, os principais produtos transcritos pelo gene *GNAS1* são: a conhecida proteínas G_sⓈ, a NESP 55 (*neuroendocrine secretory protein 55*) que é uma proteína semelhante à cromogranina com expressão em tecidos neuroendócrinos (medula adrenal, hipófise, hipotálamo e outras regiões do cérebro), as XLⓈ (XLN1a e XLN1b) isoformas longas da G_sⓈ, também

Tabela 1. Doenças endócrinas associadas às alterações da proteína G.

G _s Ⓢ		Linhagem
Perda de função Pseudo-hipoparatiroidismo tipo Ia Pseudo-hipoparatiroidismo tipo Ib	Mutações pontuais, deleções, inserções do <i>GNAS1</i> Alterações no locus do <i>imprinting</i> do <i>GNAS1</i>	Germinativa Germinativa
Ganho de função Adenomas de hipófise e tireóide Tumor de célula de Leydig Síndrome de McCune Albright AIMAH	Mutação pontual Arg ²⁰¹ ou Gln ²²⁷ inibe GTPase Mutação pontual Arg ²⁰¹ inibe GTPase Mutação pontual Arg ²⁰¹ inibe GTPase Mutação pontual Arg ²⁰¹ inibe GTPase	Somática Somática Somática Somática
Ganho e Perda de função Testotoxicose e Pseudo-hipoparatiroidismo tipo Ia	Mutação pontual Arg ³⁸⁵ Ser, aceleração da dissociação do GDP e ativação do sinal a 34°C (testículo) e inativação da G _s Ⓢ a 37°C (paratiroides)	Germinativa

apresentam expressão em tecidos neuroendócrinos (pituitária, adrenal, coração, pâncreas) com funções biológicas ainda não determinadas (87-90).

Em humanos e ratos, a região promotora da proteína NESP55 está metilada somente no alelo paterno, sendo o alelo materno transcrito, e, contrariamente, a região promotora da XL α s está metilada no alelo materno com transcritos somente do alelo paterno. Estudos do padrão de metilação em ratos e fetos humanos, da região promotora da proteína G α s, mostraram que essa região parece constituir a marca do *imprinting*. A expressão da proteína é bialélica em alguns tecidos (ossos) e monoalélica em outros (túbulo proximal de néfron) com *imprinting* paterno e expressão do alelo materno (91).

Doenças Associadas às Mutações Ativadoras no Gene *GNAS1*

Mutações do gene *GNAS1* foram descritas primeiramente em 40% dos adenomas pituitários somatotróficos e 30% dos adenomas autônomos da tireóide. Estas mutações resultaram em hiperplasia celular e hipersecreção de hormônio de crescimento e hormônios da tireóide. A persistente ativação da adenilato-ciclase por deficiência da enzima GTPase mantém níveis elevados de AMPc, que estimulam a secreção hormonal e o crescimento destes tecidos, o suficiente para levar aos fenótipos de acromegalia e hipertireoidismo, respectivamente. Tais mutações ativadoras no códon da arginina 201 também foram detectadas em alguns tumores testiculares (células de Leydig), em tumores ovarianos, em neoplasias diferenciadas da tireóide e raramente em outros tumores endócrinos (82-84,92-96).

A mesma mutação somática do gene *GNAS1* é a base molecular da síndrome de McCune-Albright, que acarreta a substituição da arginina 201 (CGT) principalmente por histidina (CAT) ou por cisteína (TGT). Esta síndrome foi descrita por McCune e Albright em 1930 e é uma doença esporádica, classicamente definida pela presença de displasia óssea fibropoliostótica, manchas "café au lait" e puberdade precoce. Variações clínicas desta tríade clássica podem ocorrer, associadas a outras endocrinopatias, tais como hipertireoidismo, acromegalia, prolactinoma e SC (97-106).

Alguns órgãos não endócrinos também podem ser afetados, incrementando o risco de mortalidade e morbidade desta patologia. Estes órgãos incluem fígado, rim, baço, trato gastrointestinal e cérebro. As anormalidades cardíacas incluem cardiomegalia, taquicardia e hipertrofia muscular asso-

ciada à morte súbita. Outras alterações raras são hiperplasia do timo, pólipos gastrointestinais, pancreatite, câncer de mama e microcefalia. As manifestações clínicas da síndrome de McCune-Albright são explicadas pelo padrão mosaico de distribuição das células que carregam o alelo mutado, caracterizando uma mutação pós-zigótica, em heterozigose, que ocorre no gene *GNAS1* durante as primeiras fases da embriogênese (102-106).

Mutações no Gene *GNAS1* na AIMAH

O CRH hipotalâmico, bem como a vasopressina, estimula a secreção do ACTH hipofisário, o que ativa a síntese de AMPc no córtex adrenal através de sua ligação ao receptor de ACTH, via sub-unidade G α s da proteína G, e estimula a adenilato-ciclase. O AMPc, por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA), que fosforila fatores de transcrição nucleares, incluindo o modulador de elemento de resposta a AMPc (CREM), proteína de ligação ao elemento de resposta a AMPc (CREB) e fator de transcrição ativador 1 (ATF-1). Estes fatores de transcrição ligam-se à sequência do elemento de resposta de AMPc (CRE) e modulam a expressão de gene-alvo (107).

Como descrito anteriormente, em vários pacientes com SC devido a AIMAH, o hipercortisolismo foi mediado pelo aumento da expressão de vários receptores anormais de membrana celular do córtex de nódulos adrenais. O mecanismo da patogênese molecular desta expressão aumentada levando ao hipercortisolismo não está estabelecido (5,108).

Mutações inativadoras do gene supressor tumoral *PRKARIA*, sub-unidade regulatória mais abundante da proteína quinase A, modulador principal de sinalização de AMPc, foram relatadas recentemente na SC causada pela *PPNAD*, corroborando com o papel proliferativo da via do AMPc no córtex da glândula adrenal (109).

Devido ao fato do ACTH estimular a síntese e a secreção hormonal cortical via ativação da proteína G α s, Fragoso e cols. investigaram a possibilidade de mutações ativadoras nos genes *MC2-R* (codifica o receptor do ACTH) e *GNAS1* estarem envolvidos na patogênese molecular da AIMAH (110).

Nenhuma anormalidade na região codificadora do gene *MC2-R* foi identificada neste estudo. Até hoje, somente um único estudo identificou uma mutação ativadora no gene *MC2-R* (111), sugerindo que mutações ativadoras no gene do receptor do ACTH não representam um mecanismo freqüente da SC devido a AIMAH (112).

Mutações que ocorrem naturalmente nos códon 201 e 227 que alteram a atividade da GTPase

no gene *GNAS1* têm sido descritas em tumores autônomos produtores de hormônios. Mutações envolvendo substituições de cisteína ou histidina e, raramente, serina por arginina no códon 201 ou arginina por glutamina no códon 227 foram descritas pela primeira vez em tumores hipofisários produtores de GH (81-83). Mutações *gsp* similares têm sido descritas em adenomas funcionais da tireóide e raramente em tumores adrenais, e tumores de células de Leydig e ovarianos (113,114). Mutações somáticas *missense* que afetam o códon da Arginina²⁰¹, importante para o controle da atividade GTPase, levam à ativação constitutiva da proteína G α s, da mesma forma que ocorre na síndrome de McCune-Albright (SMA). Esta síndrome, além da tríade clássica, pode também apresentar várias endocrinopatias devido à hipersecreção hormonal do córtex adrenal, tireóide e somatotrófos hipofisários. A SMA nunca é hereditária, indicando que as mutações *gsp* presumivelmente ocorrem durante o início do período embrionário, levando à distribuição disseminada das células que carregam as mutações com uma ampla variedade de fenótipos, dependendo do tecido afetado. A SC causada por nódulos nas glândulas adrenais na SMA é uma situação rara, e em todos os casos relatados a apresentação clínica da SC só ocorreu durante os primeiros anos de vida (115-117).

Fragoso e cols. identificaram, através do DGGE (eletroforese de gel com gradiente de desnaturação) otimizado (118), seguida por seqüenciamento direto, a presença de duas mutações ativadoras diferentes (R201S e R201H) na sub-unidade α da proteína G α s, em três pacientes com SC devido a AIMAH sem características de SMA. Estas mutações ativadoras de G α s em células adrenocorticais podem aumentar os níveis de AMPc e levar à proliferação celular com formação de nódulos e secreção autônoma de cortisol (118).

A mutação R201S é rara, sendo anteriormente descrita em dois tumores secretores de GH, em um carcinoma de tireóide e em um caso com doença óssea pan-ostótica não associada à SMA (119-121).

Dois estudos anteriores realizados com pacientes com SC por AIMAH não identificaram mutações ativadoras no gene *GNAS1* através de seqüenciamento direto (11,122). Estes resultados negativos podem estar relacionados à metodologia utilizada, já que, em relação a mutações somáticas, a identificação do alelo mutado depende de sua quantidade, que pode estar diminuída devido à contaminação com tecido normal adjacente. Nesta situação, o alelo mutado pode estar abaixo do nível de detecção pelo seqüenciamen-

to direto. Em nossa experiência, o DGGE foi mais sensível na detecção de mutações somáticas de ponto do que o seqüenciamento direto (114,117). O DGGE também foi mais sensível na detecção de mutações somáticas do que o seqüenciamento direto em um estudo refinado de *screening* de mutações do receptor de TSH em DNA de nódulos tóxicos de tireóide (123). Os autores demonstraram que a quantidade mínima de DNA mutado necessária para a detecção através de DGGE era de 3-6%, enquanto que para o seqüenciamento automático era de 25-50% de DNA mutado (123).

Em resumo, duas diferentes mutações *gsp* foram identificadas por Fragoso e cols. em três de cinco pacientes com SC devido a AIMAH. Os autores postulam se as pacientes podem fazer parte do espectro da SMA com uma mutação somática tardia, levando a um defeito em apenas um tipo celular, ou se estas pacientes são os primeiros relatos de mutações ativadoras do gene *GNAS1* envolvidas na patogênese molecular da AIMAH de forma isolada (110).

Em conclusão, AIMAH tem uma etiologia heterogênea, e para responder a questão se a AIMAH deve ser incluída como um distúrbio humano causado também por mutações ativadoras do gene *GNAS1*, mais estudos serão necessários, uma vez que apenas um pequeno grupo de pacientes com AIMAH não relacionada à síndrome de McCune-Albright foi testado para mutações ativadoras da proteína G α s, utilizando um método sensível de detecção.

TRATAMENTO DA AIMAH

O tratamento clássico da AIMAH consiste na adrenalectomia bilateral, através de laparotomia ou, como cada vez mais utilizada, por cirurgia laparoscópica. A adrenalectomia por via laparoscópica tem sido empregada com sucesso na maioria dos casos e nas pequenas séries relatadas (124-126). Em alguns casos, a adrenalectomia unilateral, com manutenção parcial ou total da adrenal de menor tamanho, tem sido realizada com melhora clínica e laboratorial da SC (55,127-129). Em um único paciente relatado por Omori e cols. (2001) (130), o uso de metirapona foi capaz de controlar clínica e laboratorialmente o hipercortisolismo, sendo esta, talvez, uma medida alternativa para pacientes de alto risco cirúrgico. Como discutido anteriormente, a comprovação da regulação da esteroidogênese por receptores hormonais aberrantes na AIMAH pode, em alguns casos, propiciar um tratamento farmacológico alternativo

com sucesso, como nos casos de SC dependente de LH/hCG (46), de catecolaminas (39) e parcial e temporariamente na SC dependente de GIP (15).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

AIMAH é uma condição heterogênea na qual a secreção de cortisol pode ser aberrantemente mediada por outros hormônios como o GIP, vasopressina, catecolaminas, LH/hCG e substâncias como a serotonina. Mais raramente esta condição pode ser devida a mutações no gene codificador da sub-unidade α da proteína G. Os mecanismos moleculares responsáveis pela expressão ectópica dos receptores hormonais e/ou de seu acoplamento anormal à esteroidogênese adrenal ainda são pouco conhecidos. Embora a expressão aberrante destes receptores hormonais possa desempenhar um papel importante na iniciação da proliferação celular aumentada, bem como na esteroidogênese, é provável que eventos genéticos adicionais ocorram, como demonstrado recentemente por estudos de *microarray* (131), que comprovam a heterogeneidade clínica desta condição e identificam subgrupos distintos do ponto de vista molecular. Vários genes candidatos, possivelmente relacionados com formação e/ou progressão, estão sendo identificados, sugerindo vias moleculares que afetam a progressão do ciclo celular, adesão e transcrição como possíveis mediadores da hiperplasia adrenocortical.

REFERÊNCIAS

1. Walters W, Wilder RM, Kepler EJ. The suprarenal cortical syndromes with presentation of ten cases. **Ann Surg** 1934;100:670-88.
2. Bourdeau I, D'Amour P, Hamet P, Boutin JM, Lacroix A. Aberrant membrane hormone receptors in incidentally discovered bilateral macronodular adrenal hyperplasia with subclinical Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86(11):5534-40.
3. 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.
4. Antonini SR, Hamet P, Tremblay J, Lacroix A. Expression of ACTH receptor pathway genes in GIP-dependent Cushing's syndrome (CS). **Endocr Res** 2002;28(4):753-4.
5. Lacroix A, Ndiaye N, Tremblay J, Hamet P. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. **Endocr Rev** 2001;22(1):75-110.
6. Antonini SR, N'Diaye N, Hamet P, Tremblay J, Lacroix A. Analysis of the putative promoter region of the GIP receptor gene (GIPR) in GIP-dependent Cushing's syndrome (CS). **Endocr Res** 2002;28(4):755-6.
7. Doppman JL, Chrousos GP, Papanicolaou DA, Stratakis

CA, Alexander HR, Nieman LK. Adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia: an uncommon cause of primary adrenal hypercortisolism. **Radiology** 2000;216(3):797-802.

8. Rockall AG, Babar SA, Sohaib SA, 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.
9. Wada N, Kubo M, Kijima H, Ishizuka T, Saeki T, Koike T, et al. Adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenocortical hyperplasia: immunohistochemical studies of steroidogenic enzymes and post-operative course in two men. **Eur J Endocrinol** 1996;134(5):583-7.
10. Aiba M, Hirayama A, Iri H, Ito Y, Fujimoto Y, Mabuchi G, et al. Adrenocorticotropin hormone-independent bilateral adrenocortical macronodular hyperplasia as a distinct subtype of Cushing's syndrome. Enzyme histochemical and ultrastructural study of four cases with a review of the literature. **Am J Clin Pathol** 1991;96(3):334-40.
11. Lieberman SA, Eccleshall TR, Feldman D. ACTH-independent massive bilateral adrenal disease (AIMBAD): a subtype of Cushing's syndrome with major diagnostic and therapeutic implications. **Eur J Endocrinol** 1994;131(1):67-73.
12. Schorr I, Ney RL. Abnormal hormone responses of an adrenocortical cancer adenyl cyclase. **J Clin Invest** 1971;50(6):1295-300.
13. Hingshaw HT, Ney RL. Abnormal control in the neoplastic adrenal cortex. In: McKerns KW (ed). **Hormones and Cancer**. New York: Academic Press, 1974. p. 309-27.
14. Hamet P, Laroche P, Franks DJ, Cartier P, Bolte E. Cushing's syndrome with food-dependent periodic hormonogenesis. **Clin Invest Med** 1987;10(6):530-3.
15. Lacroix A, Bolte E, Tremblay J, Dupre J, Poitras P, Fournier H, et al. Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion - a new cause of Cushing's syndrome. **N Engl J Med** 1992;327(14):974-80.
16. Reznik Y, Allali-Zerah V, Chayvialle JA, Leroyer R, Leymarie P, Traveret G, et al. Food-dependent Cushing's syndrome mediated by aberrant adrenal sensitivity to gastric inhibitory polypeptide. **N Engl J Med** 1992;327(14):981-6.
17. Tsagarakis S, Tsigos C, Vassiliou V, Tsiotra P, Pratsinis H, Klefsas D, et al. Food-dependent androgen and cortisol secretion by a gastric inhibitory polypeptide-receptor expressive adrenocortical adenoma leading to hirsutism and subclinical Cushing's syndrome: *in vivo* and *in vitro* studies. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86(2):583-9.
18. Gremlich S, Porret A, Hani EH, Cherif D, Vionnet N, Froguel P, et al. Cloning, functional expression, and chromosomal localization of the human pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor. **Diabetes** 1995;44(10):1202-8.
19. Volz A, Goke R, Lankat-Buttgereit B, Fehmann HC, Bode HP, Goke B. Molecular cloning, functional expression, and signal transduction of the GIP-receptor cloned from a human insulinoma. **FEBS Lett** 1995;373(1):23-9. Erratum in: **FEBS Lett** 1996;381(3):271.
20. de Herder WW, Hofland LJ, Usdin TB, de Jong FH, Uitterlinden P, van Koetsveld P, et al. Food-dependent Cushing's syndrome resulting from abundant expression of

- gastric inhibitory polypeptide receptors in adrenal adenoma cells. **J Clin Endocrinol Metab** 1996;81(9):3168-72.
21. N'Diaye N, Tremblay J, Hamet P, de Herder WW, Lacroix A. Adrenocortical overexpression of gastric inhibitory polypeptide receptor underlies food-dependent Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83(8):2781-5.
 22. Chabre O, Liakos P, Vivier J, Boffari S, Bachelot I, Chambaz EM, et al. Gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulates cortisol secretion, cAMP production and DNA synthesis in an adrenal adenoma responsible for food-dependent Cushing's syndrome. **Endocr Res** 1998;24(3-4):851-6.
 23. Beck B. Gastric inhibitory polypeptide: a gut hormone with anabolic functions. **J Mol Endocrinol** 1989;2(3):169-74.
 24. Fehmman HC, Goke B. Characterization of GIP(1-30) and GIP(1-42) as stimulators of proinsulin gene transcription. **Peptides** 1995;16(6):1149-52.
 25. Yamada Y, Hayami T, Nakamura K, Kaisaki PJ, Someya Y, Wang CZ, et al. Human gastric inhibitory polypeptide receptor: cloning of the gene (GIPR) and cDNA. **Genomics** 1995;29(3):773.
 26. Yip RG, Boylan MO, Kieffer TJ, Wolfe MM. Functional GIP receptors are present on adipocytes. **Endocrinology** 1998;139(9):4004-7.
 27. Kogire M, Inoue K, Sumi S, Doi R, Takaori K, Yun M, et al. Effects of synthetic human gastric inhibitory polypeptide on splanchnic circulation in dogs. **Gastroenterology** 1988;95(6):1636-40.
 28. Nauck MA, Bartels E, Orskov C, Ebert R, Creutzfeldt W. Lack of effect of synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) infused at near-physiological concentrations on pentagastrin-stimulated gastric acid secretion in normal human subjects. **Digestion** 1992;52(3-4):214-21.
 29. Bollag RJ, Zhong Q, Phillips P, Min L, Zhong L, Cameron R, et al. Osteoblast-derived cells express functional glucose-dependent insulinotropic peptide receptors. **Endocrinology** 2000;141(3):1228-35.
 30. Miyawaki K, Yamada Y, Yano H, Niwa H, Ban N, Ihara Y, et al. Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: a study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999;96(26):14843-7.
 31. Lynn FC, Pamir N, Ng EH, McIntosh CH, Kieffer TJ, Pederson RA. Defective glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor expression in diabetic fatty Zucker rats. **Diabetes** 2001;50(5):1004-11.
 32. Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, Ihara Y, Tsukiyama K, Zhou H, et al. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. **Nat Med** 2002;8(7):738-42. Epub 2002 Jun 17.
 33. Antonini SR, N'Diaye N, Hamet P, Tremblay J, Lacroix A. Analysis of the putative promoter region of the GIP receptor gene (GIPR) in GIP-dependent Cushing's syndrome (CS). **J Steroid Biochem Mol Biol** 2004. In press.
 34. Demura R, Demura H, Nunokawa T, Baba H, Miura K. Responses of plasma ACTH, GH, LH and 11-hydroxycorticosteroids to various stimuli in patients with Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 1972;34(5):852-9.
 35. Horiba N, Suda T, Aiba M, Naruse M, Nomura K, Imamura M, et al. Lysine vasopressin stimulation of cortisol secretion in patients with adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia. **J Clin Endocrinol Metab** 1995;80(8):2336-41.
 36. Lacroix A, Tremblay J, Touyz RM, Deng LY, Lariviere R, Cusson JR, et al. Abnormal adrenal and vascular responses to vasopressin mediated by a V1-vasopressin receptor in a patient with adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia, Cushing's syndrome, and orthostatic hypotension. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82(8):2414-22.
 37. Arnaldi G, Gasc JM, de Keyser Y, Raffin-Sanson ML, Perraudin V, Kuhn JM, et al. Variable expression of the V1 vasopressin receptor modulates the phenotypic response of steroid-secreting adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83(6):2029-35.
 38. Gallo-Payet N, Guillon G. Regulation of adrenocortical function by vasopressin. **Horm Metab Res** 1998;30(6-7):360-7.
 39. Lacroix A, Tremblay J, Rousseau G, Bouvier M, Hamet P. Propranolol therapy for ectopic beta-adrenergic receptors in adrenal Cushing's syndrome. **N Engl J Med** 1997;337(20):1429-34.
 40. Campbell KK, Baysdorfer C, Antonini SR, Lacroix A. V1-Vasopressin receptor sequence and expression in adrenal Cushing's Syndrome with aberrant response to vasopressin. Poster Presentation. **The Endocrine Society's 86th Annual Meeting**. New Orleans, 2004, (Abstract P3-416, p566).
 41. Matsukura S, Kakita T, Sueoka S, Yoshimi H, Hirata Y, Yokota M, et al. Multiple hormone receptors in the adenylate cyclase of human adrenocortical tumors. **Cancer Res** 1980;40(10):3768-71.
 42. Hirata Y, Uchihashi M, Sueoka S, Matsukura S, Fujita T. Presence of ectopic beta-adrenergic receptors on human adrenocortical cortisol-producing adenomas. **J Clin Endocrinol Metab** 1981;53(5):953-7.
 43. Mircescu H, Jilwan J, N'Diaye N, Bourdeau I, Tremblay J, Hamet P, et al. Are ectopic or abnormal membrane hormone receptors frequently present in adrenal Cushing's syndrome? **J Clin Endocrinol Metab** 2000;85(10):3531-6.
 44. Tao YX, Bao S, Ackermann DM, Lei ZM, Rao CV. Expression of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene in benign prostatic hyperplasia and in prostate carcinoma in humans. **Biol Reprod** 1997;56(1):67-72.
 45. Seron-Ferre M, Lawrence CC, Siiteri PK, Jaffe RB. Steroid production by definitive and fetal zones of the human fetal adrenal gland. **J Clin Endocrinol Metab** 1978;47(3):603-9.
 46. Lacroix A, Hamet P, Boutin JM. Leuprolide acetate therapy in luteinizing hormone-dependent Cushing's syndrome. **N Engl J Med** 1999;341(21):1577-81.
 47. Wy LA, Carlson HE, Kane P, Li X, Lei ZM, Rao CV. Pregnancy-associated Cushing's syndrome secondary to a luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor-positive adrenal carcinoma. **Gynecol Endocrinol** 2002;16(5):413-7.

48. Aron DC, Schnall AM, Sheeler LR. Spontaneous resolution of Cushing's syndrome after pregnancy. **Am J Obstet Gynecol** **1990**;162(2):472-4.
49. de Lange WE, Pratt JJ, Doorenbos H. A gonadotrophin responsive testosterone producing adrenocortical adenoma and high gonadotrophin levels in an elderly woman. **Clin Endocrinol (Oxf)** **1980**;12(1):21-8.
50. Leinonen P, Ranta T, Siegberg R, Pelkonen R, Heikkila P, Kahri A. Testosterone-secreting virilizing adrenal adenoma with human chorionic gonadotrophin receptors and 21-hydroxylase deficiency. **Clin Endocrinol (Oxf)** **1991**;34(1):31-5.
51. Lefebvre H, Gonzalez KN, Contesse V, Delarue C, Vaudry H, Kuhn JM. Effect of prolonged administration of the serotonin₄ (5-HT₄) receptor agonist cisapride on aldosterone secretion in healthy volunteers. **Endocr Res** **1998**;24(3-4):749-52.
52. Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Feuilloley M, Hery F, Grise P, et al. Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin 4 receptor subtype. **Neuroscience** **1992**;47(4):999-1007.
53. Lacroix A, Mircescu H, Hamet P. Clinical Evaluation of the presence of abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. **The Endocrinologist** **1999**;9:9-15.
54. Bonnin A, Grimaldi B, Fillion MP, Fillion G. Acute stress induces a differential increase of 5-HT-moduline (LSAL) tissue content in various rat brain areas. **Brain Res** **1999**;825(1-2):152-60.
55. Mannelli M, Ferruzzi P, Luciani P, Crescioli C, Buci L, Corona G, et al. Cushing's syndrome in a patient with bilateral macronodular adrenal hyperplasia responding to cisapride: an *in vivo* and *in vitro* study. **J Clin Endocrinol Metab** **2003**;88(10):4616-22.
56. Cartier D, Lihmann I, Parmentier F, Bastard C, Bertherat J, Caron P, et al. Overexpression of serotonin 4 receptors in cisapride-responsive adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** **2003**;88(1):248-54.
57. Rodbell M, Krans HM, Pohl SL, Birnbaumer L. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. Effects of guanylnucleotides on binding of ¹²⁵I-glucagon. **J Biol Chem** **1971**;246:1872-6.
58. Rodbell M, Birnbaumer L, Pohl SL, Krans HM. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action. **J Biol Chem** **1971**;246:1877-82.
59. Spiegel AM, Shenker A, Weinstein LS. Receptor-effector coupling by G-proteins: implications for normal and abnormal signal transduction. **Endocr Rev** **1992**;13:536-65.
60. Spiegel AM, Weinstein LS, Shenker A. Abnormalities in G protein-coupled signal transduction pathways in human disease. **J Clin Invest** **1993**;92:1119-25.
61. Wess J. Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. **Pharmacol Ther** **1998**;80:231-364.
62. Gether U. Uncovering molecular mechanism involved in activation of G-protein-coupled receptors. **Endocr Rev** **2000**;21:90-1132.
63. Felig P, Baxter JD, Frohman LA. **Endocrinology and Metabolism** 3rd ed. New York: Atlis Graphics & Design, **1995**.
64. Hamm HE. The many faces of G protein signaling. **J Biol Chem** **1998**;273:669-72.
65. Spiegel AM. Signal transduction by guanine nucleotide binding proteins. **Mol Cell Endocrinol** **1987**;49:1-16.
66. Hepler JR, Gilman AG. G-proteins. **Trends Biochem Sci** **1992**;17:383-7.
67. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: Conserved structure and molecular mechanism. **Nature** **1991**;349:117-27.
68. Birnbaumer L. Receptor-to-effector signaling through G protein: roles for G_{αβγ} dimers as well as G_α subunits. **Cell** **1992**;71:1069-72.
69. Conklin BR, Bourne HR. Structural elements of G_α subunits that interact with G_α receptors and effectors. **Cell** **1993**;73:631-41.
70. Cabrera-Vera TMC, Vanhauuwe J, Thomas TO, Hamm HE. Insights into G protein structure, function and regulation. **Endocrine Rev** **2003**;24(6):765-81.
71. Arshavsky VY, Pugh EN. Lifetime regulation of G protein effector complex: emerging importance of RGS proteins. **Neuron** **1998**;20:11-4.
72. Zerangue N, Jan LY. G-protein signaling: fine-tuning signaling kinetics. **Curr Biol** **1998**;8:R313-R316.
73. Brestein G, Blank JL, Lhon DY, Exton LH, Rhee SG, Ross EM. Phospholipase C- β 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator. **Cell** **1992**;70:411-8.
74. Biddlecome GH, Brestein G, Ross EM. Regulation of phospholipase C- β 1 by Gq and m1 muscarinic cholinergic receptor. Steady-state balance of receptor-mediated activation and GTPase-activating protein-promoted deactivation. **J Biol Chem** **1996**;271:7999-8007.
75. Arshavsky VY, Bownds MD. Regulation of deactivation of photoreceptor G protein by its target enzyme and Cgmp. **Nature** **1992**;357:416-7.
76. Scholich K, Mullenix JB, Wittpoth C, Poppleton HM, Pierre SC, Patel TB. Facilitation of signal onset and termination by adenylyl cyclase. **Science** **1999**;283:1328-31.
77. Bunemann M, Hosey MM. Regulators of G protein signaling (RGS) proteins constitutively activate G_{αβγ}-gated potassium channels. **J Biol Chem** **1998**;273:31186-90.
78. Zeiger MA, Saji M, Gusev Y, Westra WH, Takiyama Y, Dooley WC, et al. Thyroid-specific expression of cholera toxin A1 subunit causes thyroid hyperplasia and hyperthyroidism in transgenic mice. **Endocrinology** **1997**;138:3133-40.
79. Weinstein LS, Yu S, Warner DR, Liu J. Endocrine manifestations on stimulatory G-protein G_α-subunit. Mutations and the role of genomic imprinting. **Endocr Rev** **2001**;22(5):675-705.
80. Spiegel AM, Weinstein LS, Shenker A. Abnormalities in G protein-coupled signal transduction pathways in human disease. **J Clin Invest** **1993**;92:1119-25.

81. Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, Vallar L. GTPase inhibiting mutations activate the α chain of G_s and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. **Nature** 1989;340:692-6.
82. Lyons J, Landis CA, Harsh G, Vallar L, Grünwald K, Feichtinger H, et al. Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. **Science** 1990;249:655-9.
83. Yang I, Park S, Ryu M, Woo J, Kim S, Kim J, et al. Characteristics of *gsp* positive growth hormone-secreting pituitary tumors in Korean acromegalic patients. **Eur J Endocrinol** 1996;134:720-2.
84. Williamson EA, Ince PG, Harrison D, Kendall-Taylor P, Harris PE. G-protein mutations in human pituitary adrenocorticotrophic hormone-secreting adenomas. **Eur J Clin Invest** 1995;25:128-31.
85. Tordjman K, Stern N, Ouaknine G, Yossiphov Y, Razon N, Nordenskjöld M, et al. Activating mutations of the G_s gene in nonfunctioning pituitary tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 1993;77:765-9.
86. Simon A, Koppeschaar HPF, Rojers JFM, Hoppener CJM. Pseudohypoparathyroidism type Ia. Albright hereditary osteodystrophy: a model for research on G protein-coupled receptors and genomic imprinting. **Neth J Med** 2000;56:100-9.
87. Kozasa T, Itoh H, Tsukamoto T, Kaziro Y. Isolation and characterization of human G_s gene. **Proc Natl Acad Sci USA** 1988;85:2081-5.
88. Hayward BE, Moran V, Strain L, Bonthron DT. Bidirectional imprinting of a single gene: *GNAS1* encodes maternally, paternally and biallelically derived proteins. **PNAS** 1998;95:15475-80.
89. Hayward BE, Bonthron DT. An imprinted antisense transcript at the human *GNAS1* locus. **Hum Mol Genet** 2000;9:835-41.
90. Pasolli HA, Klemke M, Kehlenbach RH, Wang Y, Huntner WB. Characterization of the extra large G protein α -subunit XL α s. Tissue distribution and subcellular localization. **J Biol Chem** 2000;275:33622-32.
91. Liu J, Yu S, Litman D, Chen W, Weinstein LS. Identification of a methylation imprint mark within the mouse *Gnas* locus. **Mol Cell Biol** 2000;20:5808-17.
92. O'Sullivan C, Barton CM, Staddon SL, Brown CL, Lemoine NR. Activating point mutations of the *gsp* oncogene in human thyroid adenomas. **Mol Carcinogenesis** 1991;4:345-9.
93. Suarez HG, du Villard JA, Caillou B, Schlumberger M, Parmentier C, Monier R. *gsp* mutations in human thyroid tumours. **Oncogene** 1991;6:677-9.
94. Esapa C, Foster S, Johnson S, Jameson JL, Kendall-Taylor P, Harris PE. G protein and thyrotropin receptor mutations in thyroid neoplasia. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82:493-6.
95. Siperstein AE, Miller RA, Landis C, Bourne H, Clark OH. Increased stimulatory G protein in neoplastic human thyroid tissues. **Surgery** 1991;110:949-55.
96. Williamson EA, Johnson SJ, Foster S, Kendall-Taylor P, Harris PE. G protein gene mutations in patients with multiple endocrinopathies. **J Clin Endocrinol Metab** 1995;80:1702-5.
97. Danon M, Crawford JD. The McCune-Albright syndrome. **Engelb Inn Med Kinderheilkd** 1987;55:81-115.
98. Albright F, Butler AM, Hampton AO, Smith P. Syndrome characterized by osteitis fibrosa disseminata, areas of pigmentation and endocrine dysfunction, with precocious puberty in females. **N Engl J Med** 1937;216:727-46.
99. Grant DB, Martinez L. The McCune-Albright syndrome without typical skin pigmentation. **Acta Paediatr Scand** 1983;72:477-8.
100. Rieth KG, Comite F, Shawker TH, Cutler Jr GB. Pituitary and ovarian abnormalities demonstrated by CT and ultrasound in children with features of the McCune-Albright syndrome. **Radiology** 1984;153:389-93.
101. Maurus N, Blizzard RM. The McCune-Albright syndrome. **Acta Endocrinol Suppl (Copenh)** 1986;279:207-17.
102. Shenker A, Weinstein LS, Moran A, Pescovitz OH, Charest NJ, Boney CM, et al. Severe endocrine and nonendocrine manifestations of the McCune-Albright syndrome associated with activating mutations of stimulatory G protein G_s . **J Pediatr** 1993;123:509-18.
103. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. **N Engl J Med** 1991;325:1688-95.
104. Schwindinger WF, Francomano CA, Levine MA. Identification of a mutation in the gene encoding the α subunit of the stimulatory G protein of adenylyl cyclase in McCune-Albright syndrome. **Proc Natl Acad Sci USA** 1992;89:5152-6.
105. Riminucci M, Fisher LW, Majolagbe A, Corsi A, Lala R, de Sanctis C, et al. A novel *GNAS1* mutation, R201G, in McCune-Albright syndrome. **J Bone Miner Res** 1999;14:1987-9.
106. Mockridge KA, Levine MA, Reed LA, Post E, Kaplan FS, Jan de Beur SM, et al. Polyendocrinopathy, skeletal dysplasia, organomegaly, and distinctive facies associated with a novel, widely expressed G_s mutation. **Am J Hum Genet** 1999;65(Suppl):A426 (Abstract).
107. Stratakis CA, Kirschner LS. Clinical and genetic analysis of primary bilateral adrenal diseases (micro and macronodular disease) leading to Cushing's syndrome. **Horm Metab Res** 1998;30:456-63.
108. Groussin L, Perlemoine K, Confesse V, Lefebvre H, Tabarin A, Thieblot P, et al. The ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor is frequent in adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia, but rare in unilateral tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 2002;87:1980-5.
109. Groussin L, Perlemoine K, Louvel A, Leheup B, Lufon J, Bertagna X, et al. Mutations of the *PRKARIA* gene in Cushing's syndrome due to sporadic primary pigmented nodular adrenocortical disease. **J Clin Endocrinol Metab** 2002;87:4324-9.
110. Fragoso MCBV, 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 Metab** 2003;88(5):2147-51.
111. Malchoff DM, Thorner MO, Orth DN, Aloï JA, Carey RM, MacGillivray D, et al. Functional consequences of a naturally occurring mutation of type 2 melanocortin (ACTH)

- receptor. **Program of the 10th International Congress of Endocrinology**, San Francisco, CA, **1996** (Abstract P3-576).
112. Latronico AC, Reicke M, Mendonça BB, Arai K, Mora P, Allolio B, et al. No evidence for oncogenic mutations in the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical neoplasms. **J Clin Endocrinol Metab** **1995**;80:875-7.
113. Kobayashi H, Usui T, Fukata J, Yoshimasa T, Oki Y, Nakao K. Mutations analysis of Gs α , adrenocorticotropin receptor and p53 genes in patients with adrenocortical neoplasms: including a case of Gs α mutation. **Endocr J** **2000**;47:461-6.
114. Fragoso MCBV, Latronico AC, Carvalho FM, Zerbini MCN, Marcondes JAM, Araujo LMB, et al. Activating mutation of the stimulatory G protein (*gsp*) as a putative cause of ovarian and testicular human stromal Leydig cell tumors. **J Clin Endocrinol Metab** **1998**;83:2074-7.
115. Benjamin DR, McRoberts JW. Polyostotic fibrous dysplasia associated with Cushing's syndrome. **Arch Pathol** **1973**;96:175-8.
116. Kirk JMW, Brain CE, Carson DJ, Hyde JC, Grant DB. Cushing's syndrome caused by nodular adrenal hyperplasia in children with McCune-Albright syndrome. **J Pediatr** **1999**;134:789-92.
117. Danon M, Robboy SJ, Kim S, Scully R, Crawford JD. Cushing's syndrome, sexual precocity, and polyostotic fibrous dysplasia (Albright syndrome) in infancy. **J Pediatr** **1975**;87:917-21.
118. Fragoso MCBV, Lando VS, Latronico AC, Frazzatto ETS, Russell AJ, Mendonça BB. Detection of *gsp* somatic mutation through direct sequencing of heteroduplex alleles disclosed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Med Sci Monit** **2002**;8:BR15-BR18.
119. Drews RT, Gravel RA, Collu R. Identification of G protein α subunit mutations in human growth hormone (GH)- and GH/prolactin-secreting pituitary tumors by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. **Mol Cell Endocrinol** **1992**;87:125-9.
120. Yang I, Park S, Ryu M, Woo J, Kim S, Kim J, et al. Characteristics of *gsp*-positive growth hormone-secreting pituitary tumors in Korean acromegalic patients. **Eur J Endocrinol** **1996**;134:720-6.
121. Candelieri GA, Roughley PJ, Glorieux FH. Polymerase chain reaction based technique for the selective enrichment and analysis of mosaic arg 201 mutations in Gs α from patients with fibrous dysplasia of bone. **Bone** **1997**;21:201-6.
122. Bourdeau I, Lacroix A. G protein mutations (Gs α and Gi2 α) are infrequent in the adrenal tissues of patients with Cushing's syndrome secondary to ACTH-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia. **Program of the 84th Annual Meeting of The Endocrine Society**, San Francisco, CA, **2002**, p 244 (Abstract P1-385).
123. Trülzsch B, Krohn K, Wonerow P, Paschke R. DGGE is more sensitive for the detection of somatic point mutations than direct sequencing. **Biotechniques** **1999**;27:266-8.
124. Shinbo H, Suzuki K, Sato T, Kageyama S, Ushiyama T, Fujita K. Simultaneous bilateral laparoscopic adrenalectomy in ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. **Int J Urol** **2001**;8(6):315-8.
125. Imai T, Kikumori T, Shibata A, Fujiwara M, Nakao A. Laparoscopic bilateral adrenalectomy for Cushing's syndrome due to ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia. **Biomed Pharmacother** **2002**;56 Suppl 1:120s-125s.
126. Imai T, Kikumori T, Shibata A, Fujiwara M, Hibi Y, Nakao A. Laparoscopic adrenalectomy for incidentaloma and bilateral adrenal disease. **Asian J Surg** **2003**;26(2):64-70.
127. Kageyama Y, Ishizaka K, Iwashina M, Sasano H, Kihara K. A case of ACTH-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia successfully treated by subtotal resection of the adrenal glands: four-year follow-up. **Endocr J** **2002**;49(2):227-9.
128. Ogura M, Kusaka I, Nagasaka S, Yatagai T, Shinozaki S, Itabashi N, et al. Unilateral adrenalectomy improves insulin resistance and diabetes mellitus in a patient with ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. **Endocr J** **2003**;50(6):715-21.
129. Karasawa R, Hotta M, Aiba M, Takano K. Cushing's syndrome due to a large adrenocortical adenoma with histological features simulating ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia. **Pathol Int** **2004**;54(4):273-8.
130. Omori N, Nomura K, Omori K, Takano K, Obara T. Rational, effective metyrapone treatment of ACTH-independent bilateral macronodular adrenocortical hyperplasia (AIMAH). **Endocr J** **2001**;48(6):665-9.
131. Bourdeau I, Antonini SR, Lacroix A, Kirschner LS, Matyakhina L, Lorang D, et al. Gene array analysis of macronodular adrenal hyperplasia confirms clinical heterogeneity and identifies several candidate genes as molecular mediators. **Oncogene** **2004**;23(8):1575-85.

Endereço para correspondência:

Sonir R. Antonini
Laboratório de Endocrinologia
Hospital das Clínicas
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP
Av. dos Bandeirantes 3900
14049-900 Ribeirão Preto, SP
e-mail: srrantonini@hotmail.com