

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

***CRISTHIANNA VIESTI ADVINCULA COLLARES***

**HETEROGENEIDADE GENÉTICA DA SÍNDROME  
DE RESISTÊNCIA AO ACTH**

**Ribeirão Preto  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**CRISTHIANNA VIESTI ADVINCULA COLLARES**

**HETEROGENEIDADE GENÉTICA DA SÍNDROME  
DE RESISTÊNCIA AO ACTH**

*Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, para a  
obtenção do título de Doutor em  
Ciências.*

*Área de Concentração: Fisiologia.*

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lucila Leico Kagohara Elias**

**Ribeirão Preto**

**2008**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Collares, Cristiana Viesti Advincula  
**Heterogeneidade genética da síndrome de resistência  
ao ACTH.** Ribeirão Preto, 2008.  
102 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração:  
Fisiologia. Orientador: Elias, Lucila Leico Kagohara.

1. Síndrome de resistência ao ACTH. 2. *MC2R*. 3.  
*MRAP*. 4. *AAAS*. 5. Mutação.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Cristhianna Viesti Advincula Collares**

HETEROGENEIDADE GENÉTICA DA SÍNDROME DE RESISTÊNCIA AO ACTH

TESE APRESENTADA AO DEPARTAMENTO DE FISILOGIA DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucila Leico Kagohara Elias

Aprovado em: \_\_\_\_\_

### Banca examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **É tempo de começar**

Todos os dias temos novos desafios a vencer, que aos olhos de muitos podem parecer tão simples, mas que para outros são tão complexos e insuperáveis. Na verdade são fases na vida de cada um de nós que jamais deveríamos sublimar. Valorizar a raça e a nossa condição de humanos é fundamental. Aceitar que temos direito a errar, aprender e, com isso, nos superar; aceitar quem somos, como somos e sermos felizes de qualquer forma. Não podemos deixar os valores fundamentais morrerem e eles são muito maiores do que uma tese, oportunidade de trabalho, ou coisa similar. É preciso resgatar a família e dedicar o tempo de que precisam nossos pais, irmãos, maridos, esposas, filhos e avós. Resgatar a verdadeira amizade, essa que não morre nunca porque não tem compromisso ou laço sanguíneo. Resgatar a confiança nas pessoas, acreditar na palavra do outro e cultivar, praticar e propagar a honestidade. Faz-se necessário voltar a creditar para que nos tornemos homens e mulheres de fé, que acreditam num tempo melhor para as novas gerações. E para isso precisamos assumir um compromisso pessoal, agir como agentes de mudanças e nos espalharmos pela sociedade. Quem sabe possamos deixar lições de amor, amizade, perseverança, companheirismo, honestidade, caráter, fibra, garra, brio, etc, noções de princípios em que os filhos de nossos netos possam se embasar. Você e eu sabemos que o tempo é curto, afinal é tempo de começar!

*Cristhianna Viesti Advíncula Collares*

## ***Dedicatória***

Dedico este trabalho a duas duplas muito especiais, que são exemplos de seres humanos de caráter, personalidade, brilho, honestidade, simplicidade, humildade, perseverança, dignas de muita admiração. Pessoas nas quais me espelho e espero, um dia, poder refletir um pouco do brilho que elas possuem. Muito obrigada por tudo!

**Meus pais, Catharina e Manoel**, que me deram o dom mais precioso – a vida!

**Dra. Lucila e Dr. Antunes**, fundamentais nesta etapa de minha vida e que me deram essa oportunidade única!

## ***Agradecimentos***

Agradeço à MINHA FAMÍLIA pelo apoio e amor incondicional que sempre me foi dado. Obrigada Pai, Mãe, Marcelo e Josy, Manu e Rê.

Agradeço à Dra. Lucila Leico Kagohara Elias pela orientação, oportunidade e amizade. Mas costumo me referir a ela como Lú e será assim que a agradecerei diretamente: Querida Lú, jamais esquecerei tudo que fez por mim, desde todo colo que me deu nos momentos mais difíceis profissionais e pessoais, até os puxões de orelha quando foram necessários. Você é uma profissional inquestionável, competente e admirável; uma pessoa incrível, adorável, ímpar! Muito obrigada por tudo que fez por mim!

Agradeço ao Dr. José Antunes-Rodrigues pelo exemplo de profissional e ser humano que ele é. Aqueles que têm a oportunidade desta convivência sabem o que estou dizendo. Dr. Antunes é único, singular! Muito obrigada por tudo Chefe!

Muito obrigada ao Laboratório de Neuroendocrinologia, pelo espaço, pela credibilidade, pela convivência, pela amizade. Muito obrigada aos meus amigos Marina Holanda, Valci Silva, Wagner Reis, Rodrigo Rorato, Ernane Uchôa, Sílvia Rugynsk, Lílian Eslaine, Andréa Lopes, Daniela Godoy, Beatriz Borges, Maurício Benedetti, Luis Fernando, Felipe Lauand, Sérgio Lucchini, Henrique Sabino, Alexandre Giusti-Paiva, Renato Ventura, Daniel Badauê, Milene Mantovani, Lisandra Margatho.

Ao Departamento de Fisiologia agradeço por todos estes anos. Muito obrigada a todos os Docentes e Funcionários deste Departamento.

Quero agradecer de maneira especial por toda amizade, disponibilidade e ajuda que me foi dada à Elisa, Cláudia, Carlos e Fernando, funcionários da secretária do Departamento de Fisiologia.

Ao Professor Dr. Paulo Coelho e toda sua equipe, agradeço a ajuda para a realização de algumas etapas deste projeto. Muito obrigada, em especial, à Carol Kobori, que muito me ensinou e ajudou.



Obrigada ao Laboratório de Endocrinologia do HC-RP pela colaboração na minha formação. Em especial, agradeço aos Professores Dr. Ayrton Moreira, Dra. Margaret de Castro, Dra. Paula Elias e Dr. Sonir Antonini. Agradeço também à funcionária Adriana Rossi pela ajuda que me foi dada em algumas etapas na realização deste trabalho.

Obrigada aos meus amigos do Laboratório de Endocrinologia do HC-FMRP: Fernando, Fábio, Wendy e Carol.

Obrigada à Sandra Rodrigues pela amizade, cooperação e colaboração para a realização deste trabalho.

Um agradecimento especial a todos os indivíduos que concordaram em participar desta pesquisa.

Agradeço o apoio financeiro deste projeto ao CNPq, FAEPA, CAPES e FAPESP. Em especial ao CNPq que me forneceu bolsa de estudo ao longo destes quatro anos.

Às minhas amigas de SEMPRE, agradeço pelo simples fato de existirem em minha vida: Débora, Juliana, Viviane, Ana Camilla, Natália, Roberta, Maria Emília, Renata Luné, Mabel, Luciana, Ithana e Danielle. Meninas, sem vocês o mundo não teria a menor graça!

Torres, eu não poderia deixar de lhe agradecer de maneira especial e particular. Você me deu todo apoio em todos estes anos de amizade; estive ao meu lado no pátio do HC nas horas mais complicadas e caminhou junto comigo para que eu não desistisse nunca. Sempre me defendeu como “uma irmã mais nova” e fez jus a todo carinho e amor que tenho por você. Muito obrigada!

***RESUMO***

---

## RESUMO

COLLARES, C. V. A. **Heterogeneidade genética da síndrome de resistência ao ACTH.** 2008. 102f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A síndrome de resistência ao ACTH inclui a deficiência de glicocorticóide familiar (DGF) e a síndrome do triplo A. Estas doenças são raras, ambas apresentam herança autossômica recessiva e caracterizam-se pela presença de insuficiência adrenal primária. A DGF é uma doença geneticamente heterogênea caracterizada pela ausência de resposta da adrenal ao ACTH sem deficiência de mineralocorticóide. Mutações no gene do receptor do ACTH (*MC2R*) são causas de DGF. Recentemente, a proteína acessória ao receptor 2 da melanocortina (*MRAP*) foi descrita como um co-fator essencial para a expressão do *MC2R*. Mutações no gene *MRAP* foram associadas à DGF. A síndrome do triplo A é caracterizada pela tríade insuficiência adrenal, acalásia e alácrida. O gene *AAAS*, que codifica uma proteína de 547 aminoácidos denominada ALADIN, foi identificado como base molecular da síndrome do triplo A. No presente estudo realizamos a análise molecular dos genes *MC2R*, *MRAP* e *AAAS* em cinco famílias brasileiras, não relacionadas, com síndrome de resistência ao ACTH. Os probandos das famílias 1, 2, 4 e 5 apresentavam insuficiência adrenal primária precoce, enquanto o probando da família 3 apresentava acalásia e alácrida, além da insuficiência adrenal primária. O sequenciamento da região codificadora do gene *MC2R* revelou, na paciente 1, uma mutação *missense* em homozigose, que resulta na substituição de glicina por valina no códon 116 (p.Gly116Val), não descrita previamente. Seus pais

bem como seu irmão saudável apresentaram a mesma mutação em heterozigose. O estudo funcional em células Y6 transfectadas com o DNA do receptor MC2R normal ou a variante G116V mostrou uma diminuição na geração de AMPc pelo receptor mutado, quando comparado com o receptor normal. O sequenciamento do gene *MRAP* mostrou, na paciente 2, uma mutação *missense* em homozigose (p.Met1Ile) no códon de iniciação desse gene (exon 3). A análise molecular do gene *AAAS* da paciente 3 revelou, uma mutação inédita, caracterizada por deleção g.782\_783delTG no exon 1, a qual introduz um códon de parada prematuro na posição 19. Nas outras duas pacientes não encontramos nenhuma alteração nos genes analisados. A análise molecular da região promotora do *MC2R* mostrou nas pacientes 1, 2, 4 e 5 a alteração em homozigose CG para GC nos nucleotídeos -790/-791; A para G no nucleotídeo -694 e A para C no nucleotídeo -759. Estas alterações também foram encontradas em indivíduos controles. Estes resultados demonstram que mutações nos genes *MC2R* e *MRAP* estão associadas com a DGF e que a deleção encontrada no gene *AAAS* está associada com a síndrome do triplo A. A mutação p.Gly116Val do gene *MC2R*, induz perda da sinalização deste receptor, levando à resistência ao ACTH.

Palavras-chave: ACTH, *MC2R*, *MRAP*, *AAAS*, mutação, transfecção.

***ABSTRACT***

---

## ABSTRACT

COLLARES, C. V. A. **Genetic heterogeneity of ACTH resistance syndrome.** 2008. 102f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Adrenocorticotropin (ACTH) resistance syndrome includes familial glucocorticoid deficiency (FGD) and triple A syndrome. These diseases are rare and possess an autosomal recessive inheritance, characterized by early onset of primary adrenocortical insufficiency. FGD is a genetically heterogeneous disorder, characterized by failure of adrenal responsiveness to ACTH without mineralocorticoid deficiency. Mutations of the ACTH receptor gene (*MC2R*) have been associated with FGD patients. More recently, melanocortin 2 receptor accessory protein (MRAP) has been implicated as an essential cofactor for *MC2R* expression and mutations of *MRAP* gene have been described in patients with FGD. Triple A syndrome is characterized by a triad of adrenal insufficiency, achalasia and alacrima. The *AAAS* gene, encoding a protein of 547 amino acids, named ALADIN, was identified as a molecular basis of triple A syndrome. In the present study we carried out the molecular analysis of *MC2R*, *MRAP* and *AAAS* genes in five non-consanguineous Brazilian families with ACTH resistance syndrome. The DNA sequencing of the coding region of *MC2R* revealed, in patient 1, a novel homozygous missense mutation, that results in a substitution of glycine to valine at codon 116 (p.Gly116Val). Her parents and her healthy brother were heterozygous for the same mutation. The functional study of wild type and G116V *MC2R* transfected in Y6 cells showed a decrease of cAMP generation by the mutant receptor. The DNA sequencing of

the *MRAP* showed in patient 2 a homozygous missense mutation (p.Met1Ile) in the initiation codon of this gene (exon 3). The molecular analysis of *AAAS* gene in patient 3 revealed a novel g.782\_783delTG base deletion in exon 1, which introduces a premature stop codon at position 19. In the other two patients there was no change in the analyzed genes. The molecular analysis of the promoter region of *MC2R* showed in the patients 1, 2, 4 and 5 the homozygous changes CG to GC at nucleotides -790/ -791, A to G at nucleotide -694 and A to C at nucleotide -759. These alterations were also found in controls. The present results confirm that mutations of *MC2R* and *MRAP* genes are associated with FGD and that base deletion in *AAAS* gene is associated with triple A syndrome. The mutant G116V *MC2R* is devoid of signal transducing ability leading to the unresponsiveness to ACTH.

Keywords: ACTH, *MC2R*, *MRAP*, *AAAS*, gene mutation, transfection.

## ***LISTA DE FIGURAS***

---



- Figura 1.** Esquema representativo do funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.....Pg.24
- Figura 2.** Esquema representativo do mecanismo de ação do MC2R.....Pg.26
- Figura 3.** Seqüenciamento direto representativo do gene MC2R mostrando a mutação *missense* em homozigose (g. 1042G>T) no exon 2, que resulta na substituição da glicina 116 pela valina (p.Gly116Val) na paciente 1.....Pg.45
- Figura 4.** Concentração de AMPc em cultura de células Y6 transfectadas com receptor MC2R selvagem e com a variante G116V em resposta ao estímulo com diferentes concentrações de ACTH [1-24] ou forskolina. As linhas e as barras representam a média  $\pm$  DPM de três experimentos independentes, sendo que cada ponto foi determinado em duplicata. NE: não estimulado; forsk: forskolina  $10^{-5}$  M. \*  $p < 0,05$  versus MC2R selvagem.....Pg.46
- Figura 5.** Sequenciamento direto representativo do gene *MRAP* mostrando a mutação *missense* g.727G>A em homozigose no códon de iniciação do exon 3 (p.Met1Ile) na paciente 2.....Pg.47
- Figura 6.** Sequenciamento direto representativo do gene *AAAS*, mostrando a deleção g.782-783delTG no exon 1 em homozigose na paciente 3. Sua mãe apresentou a mesma mutação em heterozigose.....Pg.48
- Figura 7.** Seqüenciamentos representativos de fragmentos da região promotora do gene *MC2R* mostrando as variações existentes no nucleotídeo -694. A: heterozigose AG; B: homozigose GG.....Pg.51
- Figura 8.** Seqüenciamentos representativos de fragmentos da região promotora do gene *MC2R* mostrando as variações existentes no nucleotídeo -759. A: heterozigose AC; B: homozigose AA; C: homozigotos CC.....Pg.52

**Figura 9.** Seqüenciamentos representativos de fragmentos da região promotora do gene *MC2R* mostrando a inversão de posição dos nucleotídeos -790 / -791 (GC>CG).....Pg.52

**Figura 10.** Alinhamento da seqüência de aminoácidos do MC2R de diferentes espécies (A) e dos receptores da família de receptores da melanocortina humana (B). Os aminoácidos fracamente polares conservados (glicina, alanina, serina) na da terceira hélice transmembrânica estão em negrito e sublinhados.....Pg.57

## ***LISTA DE TABELAS***

---

**Tabela 1.** Iniciadores, temperaturas de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados pelas PCRs.....Pg.35

**Tabela 2.** Dados clínicos dos pacientes com síndrome de resistência ao ACTH.....Pg.43

**Tabela 3.** Variações alélicas dos nucleotídeos -694, -759 e -790/-791 da região promotora do gene *MC2R* de 4 pacientes com DGF e 50 indivíduos controles. Em parênteses o número de indivíduos estudados para cada variante.....Pg.51

**Tabela 4.** Quantidades específicas de cada um dos reagentes utilizados nas reações de PCRs.....Pg.83

## ***SUMÁRIO***

---

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	
<b>LISTA DE TABELAS</b>	
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
1- Extração de DNA .....	34
2- Amplificação dos genes de interesse.....	34
3- Seqüenciamento automático .....	35
4- Cultura de células Y6.....	37
5- Construção do vetor de expressão, clonagem.....	37
6- Transfecção .....	39
7- Estímulo com ACRTH [1-24] de células Y6 transfectadas com MC2R .....	40
8- Dosagem de proteínas.....	40
9- Análise estatística .....	41
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
1- Casos clínicos.....	43
1. 1- Paciente 1 .....	43
1. 1a- Estímulo com ACTH de células Y6 transfectadas.....	45
1. 2- Paciente 2 .....	46
1. 3- Paciente 3 .....	47
1. 4- Paciente 4 .....	49
1. 5- Paciente 5 .....	50
2- Região promotora do MC2R .....	50
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>66</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>81</b>

Anexo 1 .....	82
1. 1- Protocolo de extração de DNA.....	82
1. 2- Protocolo de preparação do gel de agarose 1% .....	82
Anexo 2 .....	83
2. 1- Tabela 4 .....	83
2. 2- Protocolo de purificação com isopropanol 75% .....	83
Anexo 3 .....	84
3. 1- Meio LB .....	84
3. 2- Meio TY .....	84
3. 3- Meio SOB .....	84
3. 4- Meio SOC .....	84
Anexo 4 .....	85
4. 1- <i>E. Coli</i> eletrocompetentes.....	85
Anexo 5 .....	86
5. 1- Extração do DNA plasmidial .....	86
Anexo 6 .....	88
6. 1- Transfecção .....	88
Anexo 7 .....	90
7. 1- Protocolo de dosagem de AMPc .....	90
Anexo 8 .....	91
8. 1- Manuscrito aceita para publicação .....	91

## ***INTRODUÇÃO***

---



As glândulas adrenais localizam-se acima dos rins e são subdivididas em córtex e medula. O córtex subdivide-se em três zonas: zona glomerulosa (mais externa), zona fasciculada (intermediária) e zona reticular (mais interna). A zona glomerulosa é responsável pela síntese de mineralocorticóides. A zona fasciculada abrange aproximadamente 75% da adrenal e produz os glicocorticóides. A zona reticular é a menor delas e sintetiza os andrógenos adrenais. A medula adrenal é o local onde ocorre a síntese das catecolaminas (Rainey *et al.*, 2004; Elias *et al.*, 2008).

A síntese dos glicocorticóides, que ocorre na zona fasciculada do córtex adrenal, está sob influência do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que é um polipeptídeo de 39 aminoácidos sintetizado nas células corticotróficas da hipófise anterior, a partir de um precursor chamado pró-opiomelanocortina (POMC). Um importante sítio de regulação da secreção do ACTH está localizado nos neurônios hipotalâmicos do núcleo paraventricular, onde são produzidos o fator liberador de corticotrofina (CRF) e a arginina vasopressina (AVP). O CRF é um peptídeo de 41 aminoácidos que estimula a expressão do gene da POMC pelos corticotrofos hipofisários. Tanto o CRF como a AVP são liberados nos vasos porta-hipofisários (Baylis, 1991; Grossman, 1999), atingindo a hipófise anterior, onde se ligam a seus receptores específicos, CRF-R1 e receptor tipo 3 da AVP, respectivamente, estimulando a síntese e o processamento da POMC, com conseqüente secreção de ACTH.

A regulação da secreção dos glicocorticóides ocorre por um mecanismo de retroalimentação negativa, onde os glicocorticóides inibem a transcrição do gene da POMC na hipófise e a síntese e secreção do CRF e AVP no hipotálamo. A regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal está esquematizado na figura 1 que se segue:

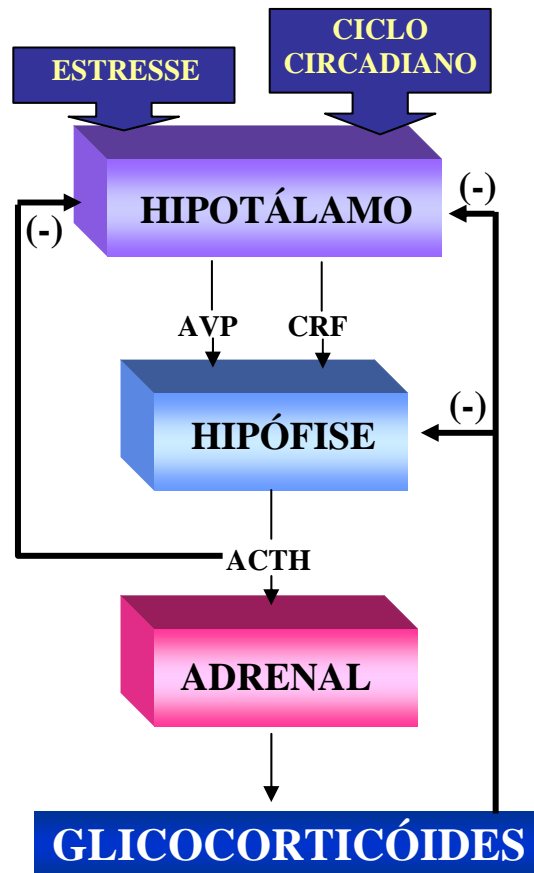


Figura 1. Esquema representativo do funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

As ações do ACTH são mediadas pela sua ligação com um receptor de membrana específico, acoplado à proteína G, denominado receptor de melanocortina 2 (MC2R) (Mountjoy *et al.* 1992; Clark & Cammas, 1996), o qual tem pouca afinidade por outros derivados da POMC (Cone *et al.*, 1996). O MC2R faz parte da família de receptores da melanocortina, que inclui os receptores da melanocortina denominados de 1 a 5: MC1R, MC3R, MC4R, MC5R. O MC1R é o receptor do MSH, sendo expresso em melanócitos com função na regulação da pigmentação cutânea (Mountjoy *et al.*, 1992; Cone *et al.* 1996). O MC3R é encontrado primariamente na região hipotalâmica e sistema límbico (Gantz *et al.*, 1993; Adan & Gispen, 1997) estando envolvido no controle da homeostase

energética (Williams *et al.*, 2001). O MC4R está presente no cérebro, hipotálamo, tálamo, córtex cerebral e tronco cerebral (Mountjoy *et al.*, 1994) e suas funções estão relacionadas, também, com o controle do balanço energético. O MC5R se expressa em glândulas exócrinas e músculo esquelético e está envolvido na regulação de secreções exócrinas (Chen *et al.*, 1997). Com exceção do MC2R, que é praticamente específico para o ACTH, os demais receptores da família de receptores da melanocortina ligam-se a mais de um dos hormônios derivados da POMC (Clark & Cammas, 1996; Cone *et al.*, 1996).

Os receptores acoplados à proteína G (GPCR) subdividem-se nas classes A, B, C, D e E (Kolakowski, 1994). Os GPCRs são proteínas de membrana envolvidas na comunicação entre as células e o meio que as circunda, que se dá por sinais químicos através da membrana celular. Estas proteínas fazem parte de uma superfamília funcionalmente diversa que consiste de uma cadeia simples de polipeptídeo que atravessa a bicamada lipídica da membrana por sete vezes, formando as hélices transmembrânicas (TM), características dessas proteínas (Probst *et al.*, 1992; Baldwin, 1993; Baldwin, 1994; Strader *et al.*, 1994; Kolakowski, 1994; Eilers *et al.*, 2005; Drake *et al.*, 2006, Fredholm *et al.*, 2007). Estas hélices comunicam-se alternativamente com as alças extracelulares e intracelulares. Os receptores acoplados à proteína G são ativados a partir da ligação do ligante e enviam as informações recebidas aos efetores celulares, como enzimas e canais iônicos (Bourne *et al.*, 1990; Bourne *et al.*, 1991; Sprang, 1997). Estes efetores influenciam as concentrações de segundo mensageiro, os quais regulam uma grande variedade de processos celulares, incluindo o crescimento e a diferenciação celular (Dhanasekaran *et al.*, 1995; van Biesen *et al.*, 1996). Assim, os GPCRs

parecem estar envolvidos nos mais diversos sistemas de tradução de sinais em células eucarióticas.

O receptor MC2R pertence à Classe A dentro da superfamília de receptores GPCRs. A ligação do ACTH ao seu receptor culmina com a ativação da adenilil ciclase, que por sua vez ativa a adenosina monofosfato cíclica (AMPc), segundo mensageiro desta reação, que fosforila a cascata de proteínas dependentes de AMPc (PKA), acarretando na fosforilação de proteínas específicas que regulam diferentes etapas de via esteroidogênica (Miller, 1988; Stocco & Clark, 1996). Este processo está esquematizado na figura 2:

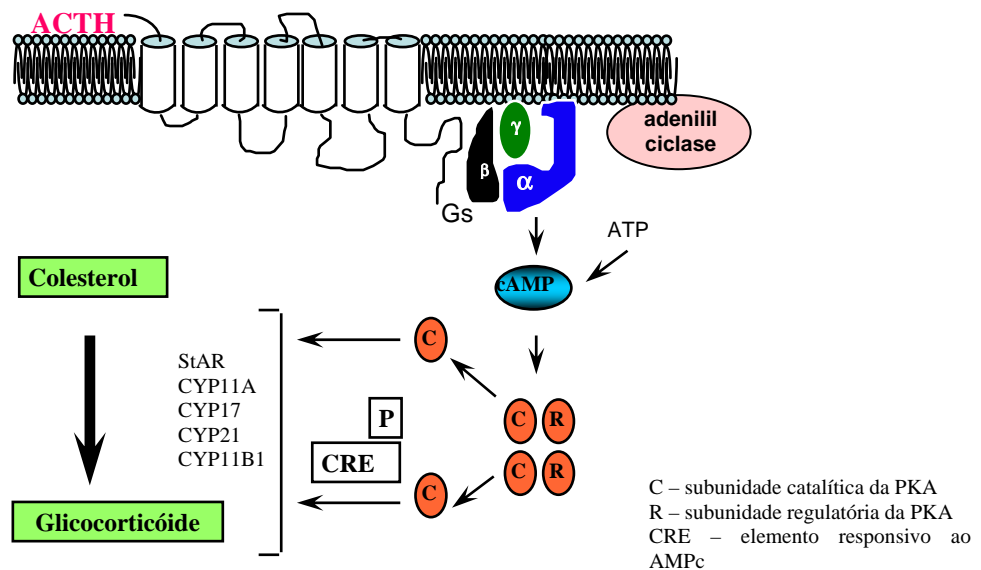


Figura 2: Esquema representativo do mecanismo de ação do MC2R.

A ligação do ACTH ao MC2R resulta em respostas específicas agudas ou crônicas (Imai *et al.*, 1990a; Imai *et al.*, 1990b; Lehoux *et al.*, 1998; Cote *et al.*, 1999). Os efeitos agudos do ACTH resumem-se na promoção da mobilização e a transferência do colesterol livre para dentro da mitocôndria por estimular a expressão da StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) e no aumento da

expressão da CYP11A1 (P450<sub>scc</sub> – P450 *side chain cleavage*) com conseqüente aumento da síntese de pregnenolona (Papadopoulos, 1998; Amri *et al.*, 1996). Já os efeitos crônicos do ACTH requerem muitas horas e envolvem a regulação de muitos genes que codificam enzimas da via esteroidogênica, como CYP11A1, 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase II (3 $\beta$ -HSD), CYP 17 (P450 c17), CYP 21A2 (P450 c21) e CYP11B1 (P450 c11) (Di Blasio *et al.*, 1987; Simpson & Waterman, 1988; Miller, 1988). Muitos dos efeitos do ACTH são mediados por fatores de transcrição específicos, como, por exemplo, o fator esteroidogênico 1 (SF-1) (Sugawara *et al.*, 1997; Parker & Schimmer, 1997), que está envolvido na regulação da CYP11A e CYP17 (Morohashi *et al.*, 1993; Takayama *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1994; Clemens *et al.*, 1994; Zhang & Mellon, 1997). As análises das regiões promotoras desses genes têm levado à identificação de seqüências de regiões responsivas ao AMPc (Lacroix, 2001). Evidências crescentes indicam que a esteroidogênese adrenocortical é modulada não somente pelo ACTH, mas também por múltiplos hormônios peptídicos locais e circulantes, neuropeptídeos, neurotransmissores, íons e citocinas (Clements & Funder, 1986; Ehrhart-Bornstein *et al.*, 1998; Gallo-Payet & Guillon, 1998; Turnbull & Rivier, 1999).

Em humanos, o MC2R é codificado pelo gene *MC2R*, que está localizado no braço curto do cromossomo 18 na região 11.2 (18p11.2) e em sua estrutura genômica a região codificadora está contida em apenas 1 exon (exon 2) (Mountjoy *et al.*, 1992; Naville *et al.*, 1997). Há cerca de uma década, a clonagem do *MC2R* (Mountjoy *et al.*, 1992) possibilitou um grande avanço no estudo funcional do MC2R normal e de suas variantes que ocorrem naturalmente, permitindo melhor conhecimento da função deste receptor (Clark *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1993; Tsigos *et al.*, 1993; Weber and Clark, 1994; Weber *et al.*, 1995; Tsigos *et al.*, 1995;

Naville *et al.*, 1996; Slavotinek *et al.*, 1998; Hiroit *et al.*, 1998; Elias *et al.*, 1999; Elias *et al.*, 2000; Tsigos, 2000; Penhoat *et al.*, 2002; Swords *et al.*, 2004; Metherell *et al.*, 2006).

Um ano após a clonagem do *MC2R* humano foi caracterizada a primeira mutação neste gene em segregação com o quadro de síndrome de resistência ao ACTH, doença esta denominada Deficiência de Glicocorticóide Familiar Tipo 1 (DGF tipo 1, OMIN#202200) (Clark *et al.*, 1993). A DGF foi descrita pela primeira vez por Shepard *et al.* (1959) em duas irmãs com doença de Addison sem deficiência de mineralocorticóide. Esta é uma doença autossômica recessiva rara caracterizada pela insuficiência adrenal primária com deficiência apenas de glicocorticóide, isto é, com atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona preservada. Além disso, esta doença é caracterizada pela presença de hipoglicemia neonatal, convulsões, pigmentação cutânea excessiva, infecções freqüentes e fraqueza generalizada (Clark & Weber, 1998). Usualmente, estas manifestações ocorrem no primeiro ano de vida, podendo ocorrer mais tardiamente (Clark & Weber, 1998). As mutações no *MC2R* são encontradas em aproximadamente 25% dos pacientes com DGF (Metherell *et al.*, 2006), o que sugere o envolvimento de outros genes como causa desta doença.

Recentemente foi descrito que o *MC2R* necessita de uma proteína acessória fundamental para sua translocação do retículo para a membrana plasmática, bem como para sua expressão na membrana plasmática. Esta proteína, denominada proteína acessória ao receptor 2 da melanocortina (MRAP) (Metherell *et al.*, 2005), possui uma única hélice transmembrânica e é codificada pelo gene *MRAP*. No homem, este gene está localizado no braço longo do cromossomo 21, na região 2 2.1 (21q22.1) e codifica duas isoformas distintas desta proteína: MRAP- $\alpha$  e MRAP- $\beta$

(Roy *et al.*, 2007). Atualmente, sabe-se que a MRAP é necessária para a expressão do MC2R na adrenal, indicando a participação da MRAP no processamento, migração e/ou função do MC2R. Mutações no gene *MRAP* foram descritas em segregação com a DGF, denominada de DGF tipo 2 (OMIN#607398), em cerca de 20% dos pacientes (Metherell *et al.*, 2006).

Além da DGF, outra doença que se caracteriza pela resistência ao ACTH, é a síndrome do triplo A ou síndrome de Allgrove (OMIM#231550). Esta doença que foi descrita pela primeira vez por Allgrove *et al.* em 1978, também é uma doença genética e se caracteriza pela tríade insuficiência adrenal, acalásia e alácrima. Os pacientes com esta doença geralmente apresentam hipoglicemia decorrente da insuficiência adrenal na primeira década de vida, mas as manifestações podem ocorrer mais tardiamente, na terceira década de vida (Huebner *et al.*, 1999). Alguns pacientes ainda podem apresentar manifestações neurológicas progressivas do sistema nervoso central, periférico ou autonômico (Gazarian *et al.*, 1995; Handschug *et al.*, 2001), associadas ao retardo mental (Huebner *et al.*, 1999). Além disso, 15% dos pacientes ainda apresentam deficiência de mineralocorticóide (Prpic *et al.*, 2003). Os estudos genéticos dessa doença revelaram uma ligação do braço longo do cromossomo 12, na região 13 (12q13) com a síndrome do triplo A (Huebner *et al.*, 2000). Subseqüentemente, foi mapeado nesta região o gene *AAAS*, que codifica uma proteína de 547 aminoácidos denominada ALADIN, o qual foi identificado como base molecular desta síndrome (Tullio-Pelet *et al.*, 2000; Handschug *et al.*, 2001). Esta proteína faz parte de uma família de proteínas com repetições de triptofano e aspartato, localizadas nos complexos de poro nuclear (Cronshaw & Matunis, 2004). Apesar da função da proteína ALADIN ainda não estar estabelecida, tem sido

sugerido que pode estar envolvida na regulação do transporte nucleocitoplasmático em células específicas e no desenvolvimento de tecidos específicos (Cronshaw & Matunis, 2003). Diferentes mutações já foram descritas no gene *AAAS* de pacientes com síndrome do triplo A de origens étnicas distintas (Krumbholz *et al.*, 2006).

Assim, consideramos que o estudo molecular da resistência ao ACTH, cuja base genética é heterogênea, pode contribuir para o melhor entendimento da função do ACTH mediada pelo seu receptor em condições fisiológicas e fisiopatológicas.



## **OBJETIVOS**

O presente estudo teve como objetivos:

- 1- Análise molecular das regiões codificadoras dos genes *MC2R*, *MRAP* e *AAAS* em pacientes com síndrome de resistência ao ACTH;
- 2- Análise da região promotora do gene *MC2R* dos pacientes e de indivíduos controles;
- 3- Caracterização funcional do gene *MC2R* normal e da variante encontrada por meio de estímulo com ACTH e geração de cAMP em células eucarióticas Y6.

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

---

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, processo HCRP nº 14382 / 2005.

## **1. Extração de DNA**

Realizamos a extração de DNA do sangue periférico dos pacientes com síndrome de resistência ao ACTH e seus familiares, bem como de 50 indivíduos controles, utilizando “QIAamp Blood Kit” (QIAGEN, CA, USA), kit de extração de DNA, seguindo os procedimentos indicados pelo fabricante (Anexo 1).

## **2. Amplificação dos genes de interesse**

Todas as reações de PCR foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9600 Applied Biosystems e os produtos das PCRs foram verificados em gel de agarose 1% (Anexo 1). Os iniciadores utilizados, bem como as temperaturas de anelamento e tamanho esperado dos fragmentos específicos encontram-se sumarizados na tabela 1. Os oligonucleotídeos (iniciadores), tampões,  $MgCl_2$ , dNTP e enzima *Taq* polimerase foram obtidos da Invitrogen (CA, USA). As quantidades específicas de cada reagente utilizado encontram-se em anexo (Anexo 2).

Tabela 1 – Iniciadores, temperaturas de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados pelas PCRs.

Gene	Exon	Iniciador Sense	Iniciador antisense	Temperatura de anelamento	Tamanho do fragmento
<b>MC2R (Região codificadora)</b>	2	gtccaagtaacatccccgcctaacc	ggattctaaaaccaggatcagccatt	56°C	960 pares de bases
<b>MC2R (Região promotora)</b>		cgcttgcaaatcaactc	cttcagctctgaagcagg	56°C	915 pares de bases
<b>MRAP</b>	3	gaagctctgctggatgctgg	tgctctcgtgacttagcagg	56°C	549 pares de bases
	4	tccattcagtgttcctctt	gaatactattccattgtagg	46°C	724 pares de bases
	5	tcaggaattgcctgtgtgg	tcaaaggcataggatgctcc	56°C	599 pares de bases
	6	gaaggctggttcgaactcc	agcctcagatgcttgactcc	60°C	541 pares de bases
<b>AAAs</b>	1 e 2	aatctagccccggaaccgag	cacccaaggtaaaggggtg	55°C	1069 pares de bases
	3 e 4	tgaaactgtagagaggac	gacctgcaaggataggaatg	57°C	592 pares de bases
	5 e 6	cttcagaggtaggagtggt	gaaccaaggctggcaaggg	57°C	552 pares de bases
	7	atcatccttctctgtggc	gtgaggacaaagaactctcc	57°C	343 pares de bases
	8	tgagcccagatggccatc	ccaggatttctgctgctct	57°C	653 pares de bases
	9 e 10	ttgtacattagagaggccag	aggcaggagaaggtatgtct	55°C	523 pares de bases
	11-14	ccaatggcccctgatgctc	agcaggcaaccggaggcaag	65°C	970 pares de bases
	15 e 16	ggtctggacttccaccagc	tgtaccccactgcaactccc	57°C	614 pares de bases

### 3. Sequenciamento automático

Para a realização dos sequenciamentos, os produtos de PCR de todos os genes analisados foram previamente submetidos a uma reação de purificação por digestão enzimática, seguindo o protocolo abaixo:

- Produto da PCR - 10µL
- Exonuclease (Exonuclease I – Amershan Pharmacia Biotech) - 1µL
- Fosfatase alcalina (Shrimp alkaline phosphatase – Amershan LIFE SCIENCE) - 1µL

Esta reação foi mantida a 37°C por 15 minutos e, em seguida, mantida a 80°C por 15 minutos. A seguir, as amostras foram usadas nas reações de sequenciamento, que foram realizadas com o kit comercial ABI Prism® Big Dye™

Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (PE Applied Biosystem CA, USA).

O protocolo da reação de seqüenciamento foi realizado como descrito abaixo:

*Terminator Ready Reaction Mix* ----- 4  $\mu$ L  
 Produto da PCR ----- 5 – 20 ng  
*Primer Interno* ----- 5 pmol  
 Água DEPC ----- q.s.p 20  $\mu$ L

Esta reação foi submetida a 25 ciclos em termociclador GeneAmp PCR System 9600 Applied Biosystems, nas seguintes condições: 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Após as reações de seqüenciamento as amostras foram purificadas pelo método de purificação com isopropanol a 75% (Anexo 2) e, a seguir, foi realizado o seqüenciamento utilizando-se o seqüenciador automático ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystem CA, USA).

A quantidade do produto de PCR purificado que foi utilizado em cada reação de seqüenciamento foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando-se marcador quantitativo de DNA ( $\phi$ x 174 - Fermentas).

Os resultados dos sequenciamentos da região codificadora e promotora do gene *MC2R* foram comparados com os dados depositados no banco de dados *GenBank* n<sup>o</sup>. X65633 e n<sup>o</sup>. Y10100, respectivamente. A análise do gene *MRAP* foi realizada de acordo com a seqüência do *GenBank* n<sup>o</sup>. NM178817 (isoforma 1) e n<sup>o</sup>. NM206898 (isoforma 2) e no banco de dados Ensembl n<sup>o</sup>. ENSG00000170262. A seqüência consenso para avaliação dos resultados obtidos para o gene *AAAS* foi obtida a partir da referência *GenBank* n<sup>o</sup>. NM015665 e do banco de dados do Ensembl n<sup>o</sup>. ENSG00000094914.

Para designação das mutações utilizamos a nomenclatura da *Human Genome Variation Society*, que pode ser encontrada no site <http://www.hgvs.org>

#### 4. Cultura de células Y6

A alíquota de células Y6 utilizadas no presente estudo foi gentilmente cedida pelo Professor Bernard P Schimmer, Banting & Best Department of Medical Research, University of Toronto, Canadá. As células Y6 são mutantes espontâneas provenientes da linhagem de células Y1 originalmente isoladas de tumor de adrenal de camundongo, que não expressam receptor endógeno de ACTH, mas são capazes de expressar o receptor transfectado (Schimmer *et al.*, 1995; Rainey *et al.*, 2004).

As células Y6 foram cultivadas em meio de cultura DMEM/F10, contendo 15% de soro de cavalo inativado (Gibco), 5% de soro bovino fetal (Sigma) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco). A cultura de células foi mantida em incubadora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 5. Construção do vetor de expressão, clonagem

Para a construção do vetor de expressão foi realizada a PCR nas condições pré-estabelecidas para o *MC2R*, porém utilizando-se a enzima *Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity* (Invitrogen, CA, USA). O fragmento amplificado foi verificado em gel de agarose. Adicionou-se a 4 µL da reação de PCR, 1 µL de solução salina e 1 µL do plasmídeo (pcDNA3.1/V5-His TOPO, Invitrogen, CA, USA). Esta reação, a qual chamamos de **A**, foi agitada e deixada em temperatura ambiente por 20 minutos para que o gene de interesse fosse inserido dentro do plasmídeo. Após este período, as etapas subseqüentes procederam-se no gelo.

Para a realização da eletroporação, bactérias *E. coli*, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Paulo Sérgio Rodrigues Coelho (Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, FMRP-USP), foram previamente preparadas

para se tornarem eletro-competentes. Para este procedimento, coletou-se colônias de *E. coli* cultivadas em meio LB (Luria-Betani, Anexo 3) agar para o cultivo em meio Ty (Anexo 3) à temperatura ambiente. Seguiram-se três processos de lavagem em água milliQ e duas lavagens com glicerol 10%. O conteúdo final foi alíquotado e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  (40  $\mu\text{L}$  em cada tubo). O protocolo detalhado deste procedimento encontra-se em anexo (Anexo 4).

A transformação foi realizada a partir da reação **A**, da qual se retirou 3  $\mu\text{L}$  que foram adicionados a um frasco contendo bactérias *E. coli* eletro-competentes (HD10 beta) e agitados levemente. Deixou-se esta reação por 30 minutos no gelo que, em seguida, foi colocada nas cubetas apropriadas para eletroporação. Imediatamente após o choque, adicionou-se 1000  $\mu\text{L}$  de meio SOC (preparado a partir do meio SOB, Anexo 3) e incubou-se por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  sob agitação de 100 rpm. Procedeu-se com centrifugação do conteúdo por 1 minuto e retirou-se aproximadamente 700  $\mu\text{L}$  do sobrenadante. O conteúdo restante foi semeado em duas placas seletivas de LB agar contendo ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), pré-aquecidas a  $37^{\circ}\text{C}$ , que foram incubadas por um período de 16-18 horas (*overnight*) a  $37^{\circ}\text{C}$ .

A identificação de colônias com o vetor de expressão foi realizada coletando-se colônias aleatoriamente, as quais foram, individualmente, colocadas em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e mantidas em agitação de 150 rpm a  $37^{\circ}\text{C}$ , por um período de 16-18 horas. Esta solução denominamos de **B**.

A partir da solução **B** realizou-se o procedimento para a extração do DNA plasmidial (MiniPrep), baseado no protocolo de Sambrook & Russell (2001), com algumas modificações. O protocolo detalhado encontra-se no Anexo 5.

Para a verificação da inserção correta do fragmento de interesse no plasmídeo, após a extração do DNA plasmidial, realizou-se a digestão enzimática. O



DNA foi colocado, juntamente com o tampão específico e a enzima BXTS I a 55°C por 1 hora e 30 minutos. Em seguida, adicionou-se RNase (200 µg/mL) e deixou-se a 65°C por 15 minutos. Após a digestão, o tamanho do inserto foi verificado em gel de agarose 1%.

Para confirmar-se a seqüência correta do inserto, realizou-se o sequenciamento automatizado a partir do DNA extraído, de acordo com o protocolo previamente descrito, utilizando os *primers* referentes ao inserto (5'-gtccaagtaacatccccgccttaacc-3' e 5'-ggattctaaaaccagggatcagccatt-3') e também os *primers* do plasmídeo (T7 5'-taatacgactcactataggg- 3' e BGH 5'-tagaaggcacagtcgagg-3').

A colônia contendo o clone de interesse foi então cultivada em 100 mL de meio LB líquido, sob agitação de 150 rpm, a 37°C por 16-18 horas (*overnight*). A partir dessa cultura, realizou-se outra preparação por kit (MidiPrep, Invitrogen), para a obtenção de DNA a ser utilizado para transfecção. O DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro.

## **6. Transfecção**

As células Y6 foram transfectadas com o DNA do receptor selvagem e com o DNA da variante G116V. Este processo foi realizado com a utilização de lipofectina (Invitrogen, CA, USA). Após 72 horas, adicionou-se Geneticina (G418, Invitrogen, CA, USA) na concentração de 200 µg/mL. Esta concentração de G418 foi mantida nas culturas por aproximadamente 25 dias para que fossem selecionados apenas clones contendo o inserto de interesse. Assim, os clones de células Y6 transfectadas com PCDNA3 contendo o receptor normal e a variante G116V foram congelados, mantendo-se um dos clones em cultura para ser utilizado no estudo funcional sob

estímulo com ACTH [1-24]. Para serem congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , os clones foram colocados em glicerol a 50% previamente autoclavado (70% da solução de cultura + 30% de glicerol 50%). O detalhamento da padronização da transfecção encontra-se em anexo (Anexo 6).

## **7. Estímulo com ACTH [1-24] de células Y6 transfectadas com MC2R**

As células Y6 expressando o receptor MC2R normal e a variante G116V foram cultivadas em placas de 96 poços ( $1 \times 10^4$  células por poço) até a confluência de 70-80%. No dia do experimento, as células foram lavadas 3 vezes, com meio de cultura puro, e em seguida incubadas com meio livre de soro contendo 3-isobutyl-1-methylxantina (IBMX) 1mmol/L, com diferentes concentrações de ACTH [1-24] ( $10^{-12}$  a  $10^{-6}$  M) ou com forskolina ( $10^{-5}$  M) por 60 minutos. Após este período as células e o sobrenadante foram coletados para a quantificação de AMPc por método imunoenzimático, utilizando-se o ensaio comercial cAMP Enzymeimmunoassay Biotrak TM (EIA) System (dual range) (Amersham) (Anexo 7).

Em cada experimento realizado, 4 poços contendo as células foram lavados também por 3 vezes com meio sem soro, seguido de adição de 500  $\mu\text{l}$  de meio de cultura sem soro e ao final do experimento as células foram coletadas juntamente com o meio e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para dosagem de proteína.

## **8. Dosagem de proteína**

Para esta dosagem foi utilizado o método colorimétrico. O reagente de cor (BIO-RAD Protein Assay – *dye reagent concentrate*) foi diluído cinco vezes em água milliQ e filtrado. O padrão de albumina (Sigma) foi diluído na concentração de 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e a partir desta solução concentrada realizou-se a curva do ensaio com

diluições sequenciais (2000 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,25 µg/mL e 31,2 µg/mL). Utilizando microplacas de 96 poços, foram pipetados 10 µl de cada padrão da curva ou 10 µl de cada amostra por poço e adicionou-se a cada poço 200 µl do reagente de cor previamente preparado. Todos os pontos foram dosados em duplicata. A leitura foi realizada após cinco minutos em comprimento de onda de 595nm, em leitor de microplaca Espectra – MAX – 250, utilizando-se o programa SOFT max PRO.

## **9. Análise estatística**

Os dados de geração de AMPc estão apresentados como média  $\pm$  DPM. A diferença entre os grupos foi analisada por meio de teste t, com nível de significância de  $p < 0,05$ . Utilizou-se o Programa Graph-Pad Prism 3,0 (San Diego, CA).

***RESULTADOS***

---

Todas as amostras de DNA dos indivíduos estudados resultaram em amplificação, por PCR, dos genes *MC2R*, *MRAP* e *AAAS* com fragmentos de tamanho esperado, afastando-se grandes deleções destes genes.

## 1. Casos clínicos

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com síndrome de resistência ao ACTH estão sumarizados na tabela 2.

Tabela 2: Dados clínicos dos pacientes com síndrome de resistência ao ACTH.

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5
<b>Diagnóstico clínico</b>	FGD	FGD	Triplo A	FGD	FGD
<b>Sexo</b>	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino
<b>Idade de início dos sintomas</b>	Ao nascimento	11 meses	14 anos	2 anos	Ao nascimento
<b>Idade do diagnóstico</b>	4,5 anos	1 ano e 10 meses	17 anos	7 anos e 9 meses	10 meses
<b>cortisol</b>	0,7 µg/dl	indetectável	<1,2 µg/dl	<0,5 µg/dl	0,1 µg/dl
<b>ACTH</b>	940 pg/ml	330 pg/ml	2140 pg/ml	10670 pg/ml	2970 pg/ml
<b>Resposta ao ACTH</b>	não	não	-----	não	-----
<b>Hipoglicemia</b>	Sim (25 mg/dl)	Sim	Não	Sim (49 mg/dl)	Sim (20 mg/dl)
<b>17OHprogesterona</b>	10 ng/dl	-----	-----	-----	4 ng/dl
<b>DHEAS</b>	-----	-----	<3,9 µg/dl	<20 µg/dl	1 µg/dl
<b>Sódio/ Potássio (mEq/l)</b>	-----	-----	132/5,2	140/4,2	137/5,3
<b>ARP</b>	-----	-----	19,9 ng/ml/hr	-----	1,6 ng/ml/hr
<b>hiperpigmentação</b>	Sim	Sim	-----	Sim	discreta
<b>Estatura</b>	>P97	>P97	P10	P90-95	>P97
<b>Acalásia</b>	Não	Não	Sim	Não	Não
<b>Alácrima</b>	Não	Não	Sim	Não	Não

### Paciente 1

Paciente 1 é do sexo feminino, nascida de pais consangüíneos, com peso ao nascimento de 3600 g e comprimento de 50 cm. No período neonatal apresentou convulsões associadas à hipoglicemia e com 1 ano apresentou dificuldade respiratória e convulsões. Seus pais relataram um filho que morreu aos 10 meses

após episódio de convulsão. Aos 4 anos, foi admitida no hospital com febre, pneumonia, vômito, convulsões, hipoglicemia (glicose sanguínea de 25 mg/dl) e hipotermia (35,5°C). Ao exame constatou-se estatura acima do percentil 97 e pigmentação excessiva e generalizada da pele. Não se observou nenhuma evidência clínica de deficiência na produção de lágrimas ou acalasia. Os exames bioquímicos revelaram concentrações plasmáticas baixas de cortisol (0,7 µg/dl) e elevadas de ACTH (940 pg/mL). Não houve resposta do cortisol ao teste de estímulo com ACTH. As concentrações plasmáticas de 17 hidroxiprogesterona estavam de acordo com a referência (100 ng/dl). Foi realizado o diagnóstico de DGF e iniciado tratamento com glicocorticóide, havendo melhora dos sintomas com crescimento normal, redução da pigmentação cutânea excessiva e ausência de infecções e hipoglicemia.

A análise molecular do DNA desta paciente revelou uma nova mutação no exon 2 do *MC2R*, com uma substituição em homozigose de uma guanina por uma timina (g.1042G>T), que resulta na substituição de uma glicina por uma valina no códon 116 (p.Gly116Val) (figura 3), a qual está localizada na terceira hélice transmembrânica. Seus pais e seu irmão mais novo assintomático apresentaram a mesma mutação (p.Gly116Val) em heterozigose.

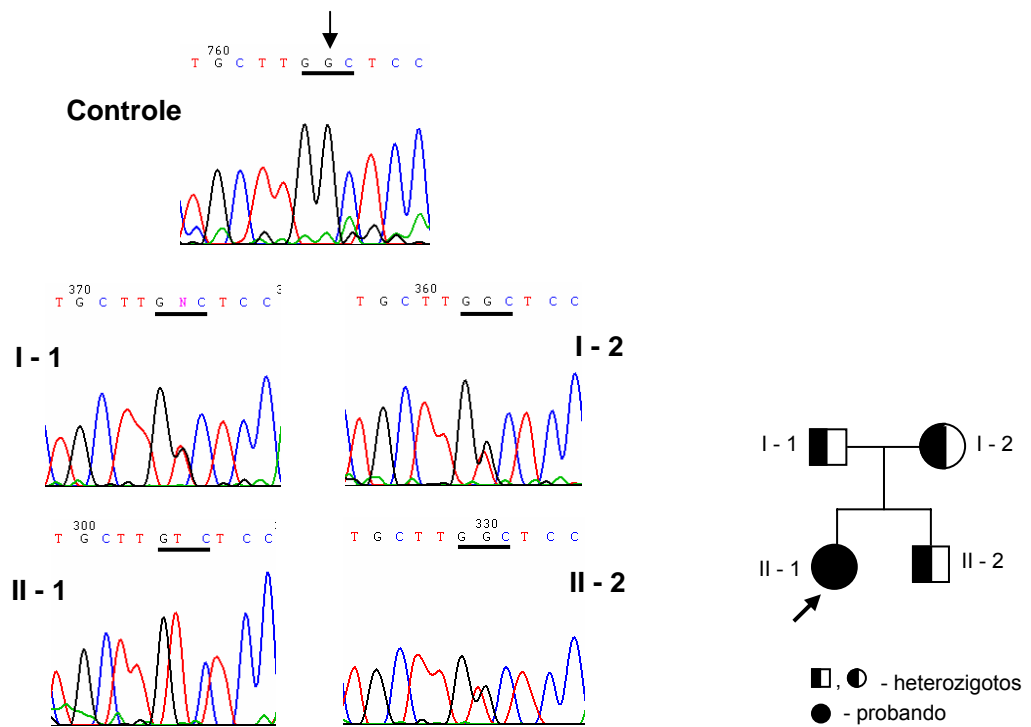


Figura 3. Seqüenciamento direto representativo do gene MC2R mostrando a mutação *missense* em homozigose (g. 1042G>T) no exon 2, que resulta na substituição da glicina 116 pela valina (p.Gly116Val) na paciente 1.

### Estímulo com ACTH de células Y6 transfectadas

As células Y6 expressando o receptor MC2R selvagem apresentaram liberação de AMPc em um padrão dose-dependente, quando estimuladas com ACTH [1-24], porém houve uma redução na liberação de AMPc com a dose mais elevada de ACTH [1-24] ( $10^{-6}$  M). Observou-se que as células Y6 expressando o receptor mutante G116V apresentaram uma redução na geração de AMPc quando comparadas com o receptor selvagem (figura 4).

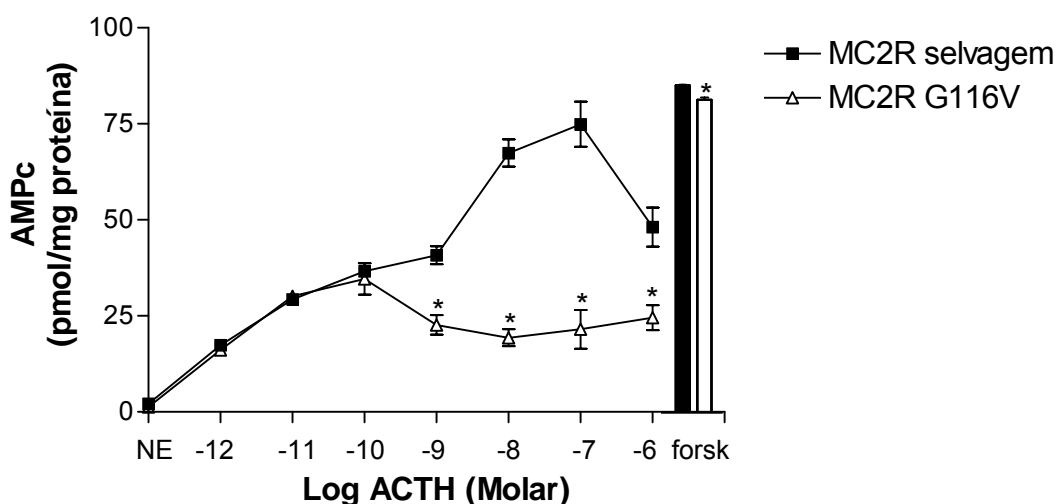


Figura 4. Concentração de AMPc em cultura de células Y6 transfectadas com receptor MC2R selvagem e com a variante G116V em resposta ao estímulo com diferentes concentrações de ACTH [1-24] ou forskolina. As linhas e as barras representam a média  $\pm$  DPM de três experimentos independentes, sendo que cada ponto foi determinado em duplicata. NE: não estimulado; forsk: forskolina  $10^{-5}$  M. \*  $p < 0,05$  versus MC2R selvagem.

## Paciente 2

Paciente do sexo feminino, nascida de pais não consangüíneos, com peso ao nascimento de 4500 g e comprimento de 55 cm. Apresentou icterícia neonatal e aos 11 meses convulsões e hipoglicemia e infecções recorrentes. Com 1 ano e dez meses, constatou-se estatura acima do percentil 97, pigmentação excessiva e generalizada da pele e ausência de alterações neurológica. As análises bioquímicas revelaram insuficiência adrenal, com cortisol plasmático basal, bem como o cortisol após o teste de estímulo com ACTH, indetectáveis e ACTH plasmático elevado. Foi iniciada terapia de reposição com glicocorticoide e houve melhora dos sintomas.

A análise molecular do gene *MC2R* desta paciente não revelou nenhuma alteração. Ao avaliarmos o gene *MRAP*, encontramos uma mutação, em homozigose, com a substituição g.727G>A (figura 5) no códon de iniciação (p.Met1Ile). Seus pais apresentaram esta mesma substituição em heterozigose.



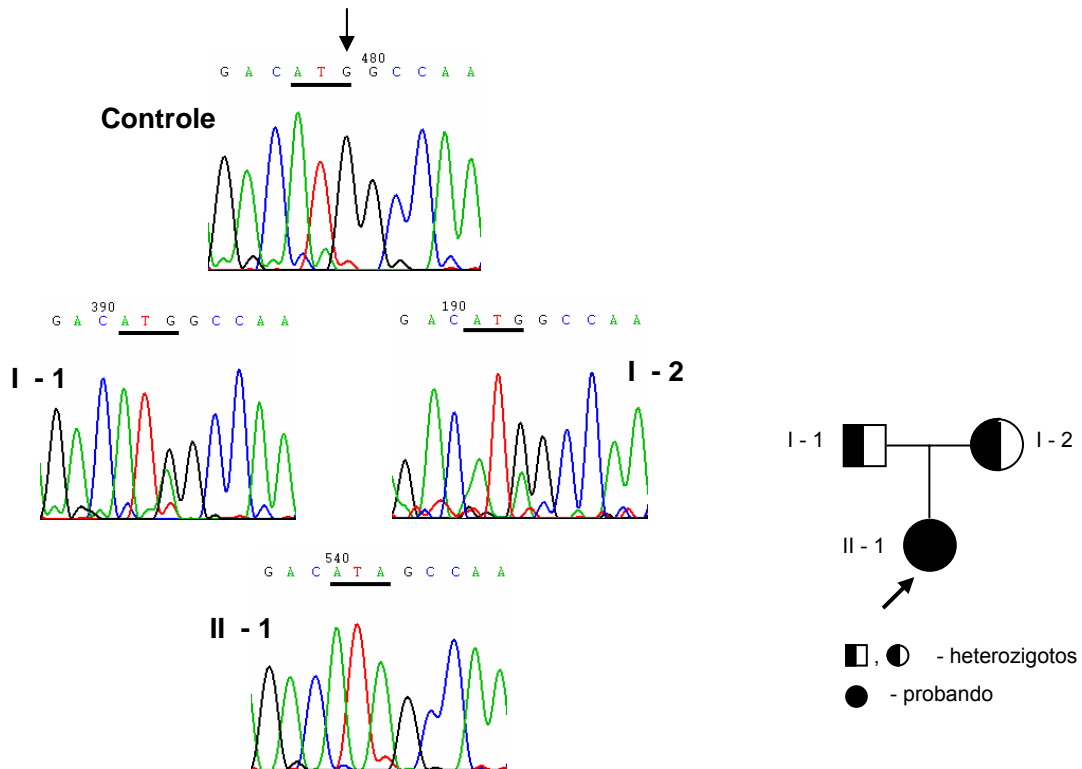


Figura 5. Sequenciamento direto representativo do gene *MRAP* mostrando a mutação missense g.727G>A em homozigose no códon de iniciação do exon 3 (p.Met1Ile) na paciente 2.

### Paciente 3

A paciente 3 é do sexo feminino, nascida de pais consangüíneos. Aos 16 anos apresentou perda de peso, náuseas, vômito, hiporexia, pigmentação excessiva da pele e língua, fraqueza de membros inferiores e adinamia. Relatava, também, choro com pouca lágrima desde a infância. Os exames laboratoriais revelaram insuficiência adrenal, com cortisol plasmático <1,2  $\mu\text{g/dl}$ , ACTH plasmático elevado (2140  $\text{pg/mL}$ ), redução de DHEA-S (<3,9  $\mu\text{g/dl}$ ) e aumento da atividade de renina plasmática (19,9  $\text{ng/mL/hr}$ ), sódio e potássio séricos de 132  $\text{mEq/l}$  e 5,2  $\text{mEq/l}$ , respectivamente. A produção de lágrima foi verificada pelo teste de Schirmer, que consiste na mensuração da produção lacrimal, utilizando-se tiras de papel padronizadas colocadas no fórnix conjuntival inferior durante um minuto. Este teste confirmou a alácrima nesta paciente. Realizou-se também o teste de manometria, que consiste no estudo detalhado da

atividade motora do esôfago, incluindo a mensuração da pressão esofágica durante a deglutição, que confirmou a presença de acalásia na paciente 3. A avaliação radiológica com ressonância nuclear magnética revelou leve compressão da transição cervico-bulbar e redução do volume da medula espinhal. A terapia de reposição com glico- e mineralocorticóide resultou em melhora dos sintomas, porém, esta paciente veio a óbito por causas desconhecidas aos 17 anos.

A análise molecular dos genes *MC2R* e *MRAP* desta paciente não mostrou nenhuma alteração. A avaliação do gene *AAAS* revelou uma nova deleção g.782\_783delTG em homozigose no exon 1 (figura 6). Esta mutação introduz um códon de parada prematuro na posição 19. O seqüenciamento do gene *AAAS* de sua mãe apresentou a mesma mutação em heterozigose.

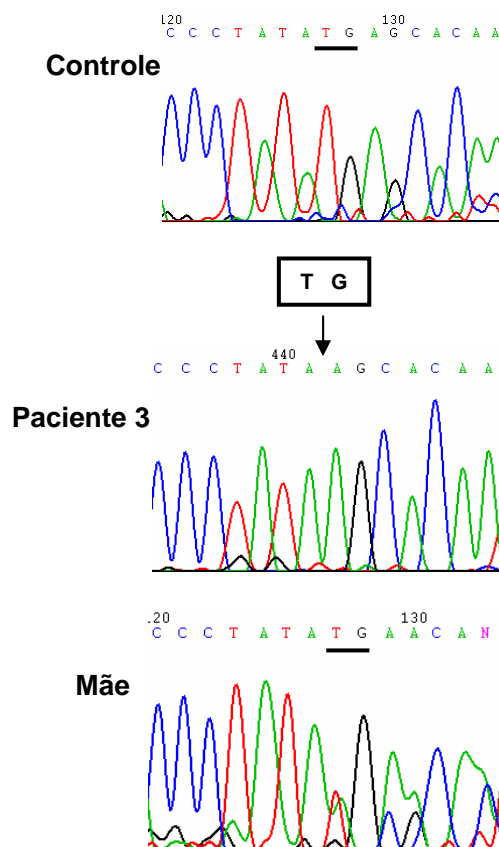


Figura 6. Sequenciamento direto representativo do gene *AAAS*, mostrando a deleção g.782-783delTG no exon 1 em homozigose na paciente 3. Sua mãe apresentou a mesma mutação em heterozigose.

#### **Paciente 4**

Paciente do sexo feminino, nascida de pais consangüíneos e apresentando, ao nascimento, peso de 3000 g. Aos dois anos de idade, apresentou pneumonia, convulsões e infecções recorrentes. Aos seis anos foi diagnosticada com febre reumática. Nenhuma evidência clínica de deficiência na produção de lágrimas ou acalasia foi notada. O histórico familiar revelou quatro irmãos falecidos (dois deles após pneumonia antes dos dois anos de vida e dois por razões desconhecidas) e cinco irmãos saudáveis vivos. Aos sete anos foi admitida no hospital apresentando pigmentação cutânea excessiva, desidratação e náusea. Os exames bioquímicos revelaram insuficiência adrenal, com cortisol plasmático basal e após teste de estímulo com ACTH indetectáveis. As concentrações de ACTH plasmático estavam muito elevadas (10.670 pg/mL). Os valores plasmáticos de sódio, potássio e glicose foram, respectivamente, 140 mEq/l, 4,1 mEq/l e 49 mg/dl. Em uma segunda avaliação laboratorial, aos 13 anos de idade, foi confirmada a ausência de resposta do cortisol ao teste de estímulo com ACTH, bem como o cortisol basal indetectável. As concentrações plasmáticas de 17-hidroxiprogesterona, aldosterona e atividade de renina foram 30 ng/dl, 6,2 ng/dl, e 2,6 ng/mL/h, respectivamente. Esta paciente está em terapia de reposição com glicocorticóide desde os sete anos de idade, com melhora dos sintomas.

As análises moleculares dos genes *MC2R*, *MRAP* e *AAAS* desta paciente não revelaram nenhuma alteração.

### **Paciente 5**

Paciente do sexo feminino, nascida de pais não-consanguíneos, apresentou convulsões associadas à hipoglicemia, icterícia e pigmentação excessiva da pele no período neonatal. Aos dez meses, ao ser examinada, constatou-se comprimento acima do percentil 97 e pigmentação cutânea moderada. Os exames bioquímicos revelaram concentrações plasmáticas reduzidas de cortisol (0,1 µg/dl) e elevadas de ACTH (2970 pg/mL). As concentrações séricas de sódio e potássio foram de 137 mEq/l e 5,3 mEq/l, respectivamente. O tratamento com glicocorticóide resultou em melhora dos sintomas.

As análises moleculares dos genes *MC2R*, *MRAP* e *AAAS* desta paciente não mostraram nenhuma alteração.

## **2. Região promotora do MC2R**

Para melhor investigar a estrutura molecular do *MC2R*, realizamos o sequenciamento da região promotora deste gene. Observamos as trocas em homozigose -694A>G, -759A>C e -790/-791CG>GC nos pacientes 1, 2, 4 e 5. Analisando 50 indivíduos controles encontramos, no nucleotídeo -694, 58% GG e 42% AG. Na posição -759 observamos 26% AA, 52% AC e 22% CC. Avaliando os nucleotídeos -790/-791 nos indivíduos controles, notamos que todos apresentavam a substituição CG>GC, como observados nos pacientes. Estes resultados estão sumarizados na tabela 3 e os sequenciamentos representativos destas substituições estão representados nas figuras 7, 8 e 9, onde se observa as alterações encontradas nos nucleotídeos -694, -759 e -790/-791, respectivamente.

Tabela 3: Variações alélicas dos nucleotídeos -694, -759 e -790/-791 da região promotora do gene *MC2R* de 4 pacientes com DGF e 50 indivíduos controles. Em parênteses o número de indivíduos estudados para cada variante.

	Posição		
	-694	-759	-790/-791
<b>Consenso (Neville <i>et al.</i>, 1997)</b>	AA	AA	CG
<b>Pacientes</b>	GG (4)	CC (4)	GC (4)
<b>Controles</b>	AA – 0% AG – 42% GG – 58%	AA – 26% AC – 52% CC – 22%	GC – 100%

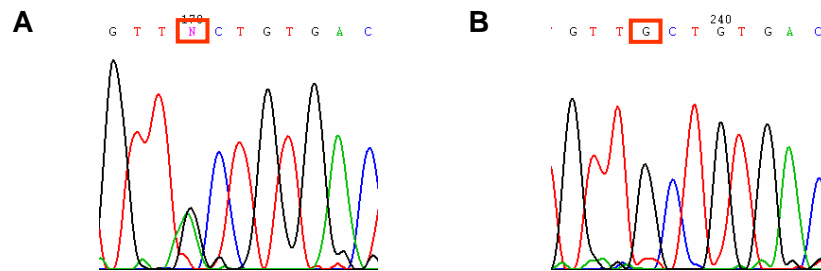


Figura 7. Seqüenciamentos representativos de fragmentos da região promotora do gene *MC2R* mostrando as variações existentes no nucleotídeo -694. A: heterozigose AG; B: homozigose GG.

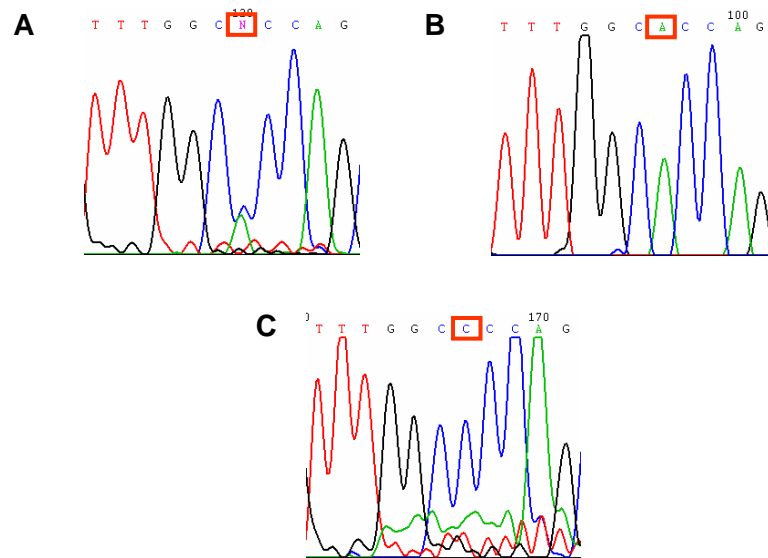


Figura 8: Seqüenciamentos representativos de fragmentos da região promotora do gene *MC2R* mostrando as variações existentes no nucleotídeo -759. A: heterozigose AC; B: homozigose AA; C: homozigotos CC.

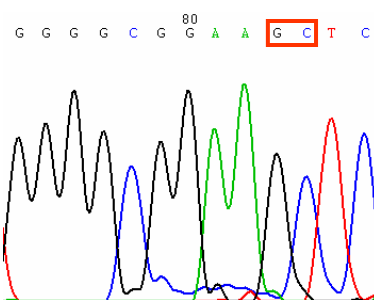


Figura 9: Seqüenciamentos representativos de fragmentos da região promotora do gene *MC2R* mostrando a inversão de posição dos nucleotídeos -790 / -791 (GC>CG).

***DISCUSSÃO***

---

O presente estudo apresenta os achados clínicos e as análises moleculares dos genes *MC2R*, *MRAP* e *AAAS* em cinco famílias com síndrome de resistência ao ACTH, onde encontramos mutações em três destas famílias.

Todos os pacientes com DGF apresentaram características clínicas típicas, como deficiência de cortisol durante o período neonatal, exceto a paciente 4, que apresentou manifestações apenas aos 2 anos de idade. Apesar das manifestações clínicas terem sido observadas precocemente em todos os pacientes, a doença foi diagnosticada durante a infância. O diagnóstico tardio da DGF se deve, provavelmente, aos sintomas inespecíficos e à ausência de perda de sal, além da raridade da doença que traz dificuldades ao diagnóstico. Dos 4 pacientes com DGF, três apresentavam estatura acima do percentil 97; sendo esta característica observada também na literatura e associada à presença de mutações do *MC2R* (Clark & Weber 1998; Elias *et al.*, 2000). Os mecanismos que levam à associação da resistência ao ACTH com a alta estatura não estão estabelecidos, não havendo alterações do sistema GH/IGF-I, como demonstrado por Clark & Weber (1998).

A paciente 3 apresentou, aos 16 anos, características clínicas típicas de síndrome do triplo A, obtendo melhora dos sintomas com o tratamento com glicocorticóide e mineralocorticóide. As manifestações da resistência ao ACTH em pacientes com síndrome do triplo A podem apresentar-se de maneira dramática, com hipoglicemias e convulsões, ou podem ocorrer de maneira mais amena, sem que haja necessidade de reposição de glicocorticóides até a adolescência ou idade adulta (Houlden *et al.*, 2002) como é o caso da paciente 3. A deficiência de mineralocorticóide está presente em aproximadamente 15% dos pacientes com síndrome do triplo A, como pode ser observado na paciente 3 pela atividade plasmática de renina elevada. Além disso, esta síndrome é frequentemente associada com uma grande variedade de



alterações neurológicas (Huebner *et al.*, 2000), como anormalidades progressivas nos sistemas nervosos central, periférico e autonômico (Houlden *et al.*, 2002) em 60% dos pacientes (Storr *et al.*, 2005). Em concordância com estas características, a paciente 3 apresentava fraqueza de membros inferiores, sendo que houve melhora deste sintoma com a utilização de glico- e mineralocorticóides. Este dado sugere que a manifestação de fraqueza muscular desta paciente poderia estar relacionada com a deficiência de glico- e mineralocorticóide, como previamente relatado em pacientes com doença de Addison (Mor *et al.*, 1987).

A paciente 3 apresentou também compressão cervico-bulbar, porém a associação desta manifestação e a mutação encontrada no gene *AAAS* necessita ainda ser elucidada, pois não há descrição prévia desta alteração na literatura em pacientes com síndrome do triplo A.

A análise molecular do gene *MC2R* da paciente 1 revelou a mutação p.Gly116Val em homozigose. Seus pais e seu irmão assintomático apresentaram a mesma mutação em heterozigose. A glicina 116 do *MC2R* está localizada na terceira hélice transmembrânica, a qual é a mais escondida dentre as hélices transmembrânicas dos receptores acoplados à proteína G (Baldwin, 1993). Esta conformação propicia o contato da terceira hélice com as outras seis hélices (Eilers *et al.*, 2005), o que implica em uma função crucial desta hélice na ativação destes receptores (Chelikani *et al.*, 2007). Dentro da superfamília GPCRs, as hélices transmembrânicas são responsáveis por transmitir o sinal de ligação do ligante, culminando com a ativação da proteína G (Eilers *et al.*, 2005). Estudos bioquímicos e de mutagênese têm demonstrado que a ativação pelo ligante de muitos receptores acoplados à proteína G causa mudanças na orientação das hélices transmembrânicas 3 e 6 (Hamm, 2001). Algumas das hélices transmembrânicas nos

GPCRs são flanqueadas por resíduos de glicina conservados, geralmente localizados próximos à região amino terminal (Baywater *et al.*, 2001).

Em estudo comparativo dos receptores das classes A e D dos GPCRs, Eilers *et al.* (2005) sugeriram a existência de micro-domínios conservados com funções similares, localizados nas hélices transmembrânicas 3, 6 e 7. A glicina é um membro do grupo-conservado de aminoácidos pequenos e fracamente polares da classe A dos GPCRs, onde agrupam-se também a alanina, serina, cisteína e treonina (Eilers *et al.*, 2005). No caso do MC2R, há uma conservação entre espécies da glicina 116, como se pode observar na figura 10. Além disso, dentro da família dos receptores da melanocortina, na posição da glicina 116 do MC2R, há um resíduo serina para o *MC1R* humano e um resíduo alanina para os *MC3R*, *MC4R* e *MC5R* humanos (Clark & Cammas, 1996). Em adição, tem sido descrito mais de 80% de conservação deste grupo de aminoácidos pequenos e fracamente polares entre os membros da classe A dos receptores acoplados à proteína G (Eilers *et al.*, 2005). Estes aminoácidos exercem ação importante como mediadores do contato entre as hélices nos receptores acoplados à proteína G, que é essencial para a estabilização do receptor inativo na ausência do ligante (Liu *et al.*, 2004).

<b>A – MC2R</b>	
<i>Homo sapiens</i>	I I D S L F V L S L L <b><u>G</u></b> S I F S L S V I A A D R Y
<i>Mus musculus</i>	I I D C M F I L S L L <b><u>G</u></b> S I F S L S V I A A D R Y
<i>Bos taurus</i>	V V D S L F I L S L L <b><u>G</u></b> S I C S L S V I A A D R Y
<i>Canis familiaris</i>	I M D S L F I L S L L <b><u>G</u></b> S I F S L S V I A A D R Y
<i>Ratus norvegicus</i>	I I D C M F V L S L L <b><u>G</u></b> S I F S L S V I A A D R Y
<i>Macaca mulatta</i>	I I D S L F V L S L L <b><u>G</u></b> S I F S L S V I A A D R Y
<b>B – Receptor da melanocortina humano</b>	
MC2R humano	I I D S L F V L S L L <b><u>G</u></b> S I F S L S V I A A D R Y
MC1R humano	V I D V I T C S S M L <b><u>S</u></b> S L C F L G A I A V D R Y
MC3R humano	I F D S M I C I S L V <b><u>A</u></b> S I C N L L A I A V D R Y
MC4R humano	V I D S V I C S S L L <b><u>A</u></b> S I C S L L S I A V D R Y
MC5R humano	V F D S M I C I S V V <b><u>A</u></b> S M C S L L A I A V D R Y

Figura 10. Alinhamento da seqüência de aminoácidos do MC2R de diferentes espécies (A) e dos receptores da família de receptores da melanocortina humana (B). Os aminoácidos fracamente polares conservados (glicina, alanina, serina) na terceira hélice transmembrânica estão em negrito e sublinhados.

A primeira mutação descrita na terceira hélice transmembrânica do MC2R foi a troca da serina 120, aminoácido fracamente polar, pela arginina, aminoácido positivamente carregado, (p.Ser120Arg), tendo sido esta mutação associada à DGF (Tsigos *et al.*, 1993). Posteriormente, o estudo funcional da variante p.Ser120Arg do receptor MC2R demonstrou perda de função deste receptor, não havendo produção de AMPc após estímulo com ACTH (Penhoat *et al.*, 2002). Outra mutação já descrita na terceira hélice transmembrânica do MC2R é a substituição da tirosina 245 por uma cisteína (p.Tyr245Cys); esta mutação não tem uma função efetiva, mas parece estar relacionada à ruptura da estrutura terciária do MC2R, alterando o local de ligação do ligante e/ou o acoplamento da proteína G pela introdução de uma cisteína extra (Fluck *et al.*, 2002).

Uma grande dificuldade no estudo funcional do MC2R decorre da expressão endógena deste receptor em células eucarióticas, o que impede a caracterização

precisa da função do MC2R transfectado (Weber *et al.*, 1993, Naville *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1998). Neste contexto, um grande avanço nos estudos funcionais do MC2R ocorreu após a caracterização de duas linhagens celulares, Y6 e OS3 (Schimmer *et al.*, 1995). Estas células são derivadas de uma linhagem de células de tumor adrenocortical de camundongos (Y1) resistentes ao ACTH e que não expressam nenhuma atividade endógena do receptor da melanocortina, mas são capazes de expressar o receptor de ACTH transfectado. Assim, tornou-se viável a comprovação da relação causal entre as mutações do gene *MC2R* e a resistência ao ACTH, com a demonstração de que as variantes resultam em perda de função do MC2R. Elias *et al.* (1999) utilizando as células Y6, demonstraram que várias mutações do MC2R associadas com a DGF, como a S74I, I44M, e R146H, resultam numa resposta diminuída na produção de AMPc em resposta ao ACTH. Demonstraram também que outras mutações, como a R128C, D103N e T159K, resultam em um deslocamento para direita da curva dose resposta ao estímulo com diferentes doses de ACTH [1-24], denotando menor sensibilidade ao agonista (Elias *et al.*, 1999).

Para investigar o efeito funcional da mutação p.Gly116Val, realizamos estudo *in vitro*, utilizando células Y6 transfectadas com receptor selvagem ou receptor mutado estimuladas com ACTH. As células Y6 expressando MC2R selvagem apresentaram geração de AMPc de maneira dose-dependente, sendo que houve um decréscimo da geração deste segundo mensageiro com a dose maior de ACTH ( $10^{-6}$  M). Este padrão de resposta tem sido descrito para outros GPCRs (Birnbaumer *et al.*, 1992; Yasuda *et al.*, 1997), indicando perda ou diminuição da eficácia do agonista na ativação do receptor. É possível que a dessensibilização do MC2R seja responsável por isto, embora se saiba que o receptor selvagem não apresenta esta resposta, exceto em elevadas concentrações de ACTH. Tem-se observado que em

células de camundongo Y1 o MC2R dessensibiliza-se lentamente em resposta ao ACTH (Baig *et al.*, 2001). O estudo funcional do receptor MC2R p.Gly116Val mostrou uma diminuição da geração de AMPc quando estimulado com ACTH, indicando que a mutação p.Gly116Val afeta a tradução de sinal levando à resistência ao ACTH.

A análise molecular do *MC2R* da paciente 2 não revelou nenhuma alteração neste gene, porém ao analisarmos o gene *MRAP* observamos uma mutação em homozigose com uma substituição de guanina por adenina (g.727G>A) no códon de iniciação (p.Met1Ile). Seus pais apresentaram a mesma mutação em heterozigose. Esta mutação missense já havia sido descrita por Metherell *et al.* (2005) em nove pacientes de oito famílias não relacionadas. Utilizando células CHO transfectadas com o MC2R e com MRAP, estes autores mostraram que o MC2R interage com a MRAP estando co-localizados tanto no retículo endoplasmático como na membrana plasmática. Mais recentemente, Roy *et al.* (2007) mostraram que o MC2R isoladamente pode expressar-se na membrana plasmática, mas é incapaz de ligar-se ao ACTH e gerar AMPc, na ausência da MRAP. Estes autores sugeriram que a MRAP poderia facilitar a expressão do MC2R na superfície celular de proteínas essenciais para o acoplamento da proteína G e a expressão da adenilil ciclase.

Mutações nos códons de iniciação de diferentes genes são relativamente incomuns quando comparadas com outros tipos de mutações. Contudo, estas mutações têm sido descritas como causas de algumas doenças humanas (Beris *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1994; Waye *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 2007). Códons de iniciação diferentes de ATG mostraram-se ineficientes em estudo utilizando células eucarióticas (Kozak, 1989). Contudo, em condições supra-fisiológicas de  $Mg^{2+}$  pode haver reconhecimento de códons de iniciação diferentes de ATG, porém, com

eficiência reduzida (Kosak, 1989). Estudos *in vitro* têm demonstrado que mutações no códon AUG impedem que a RNA polimerase reconheça o códon de tradução inicial (Chen *et al.*, 1994), podendo acarretar na tradução do RNAm a partir de um códon de iniciação subsequente, resultando em uma proteína truncada com perda grave de função. Geralmente, mutações no códon de iniciação de diferentes genes estão associadas a um fenótipo mais grave da doença. Já foi descrito que pacientes com  $\beta$  talassemia apresentam anemia mais grave quando possuem mutação no códon de iniciação do gene  *$\beta$ -globin* (Waye *et al.*, 1997). Mais recentemente, Yu *et al.* (2006) mostraram que a mutação com troca da trinca ATG pela ATC, no códon de iniciação do gene *LPL* resulta na redução da atividade catalítica da lipase lipoproteica. Assim, a mutação p.Met1Ile no gene *MRAP* resultaria em um possível códon de iniciação no códon 59, levando à formação apenas da porção C-terminal da proteína, provavelmente com perda significativa de sua função.

O diagnóstico da síndrome do triplo A na paciente 3 foi confirmado pela análise molecular do gene *AAAS*, que revelou uma mutação nova no exon 1, g.782-783delTG. Diferentes mutações em homocigose e em heterocigose no gene *AAAS* têm sido descritas em 95% dos pacientes com síndrome do triplo A de diferentes etnias (Krumbholz *et al.* 2006; Metherel *et al.*, 2006). Investigando 134 famílias com síndrome do triplo A, Krumbholz *et al.* (2006) identificaram 51 mutações distintas, sendo que a maioria delas é do tipo *nonsense*, *frameshift* ou *splice site*; apenas 8 mutações do tipo *missense* foram identificadas. Como a função da proteína ALADIN não está bem estabelecida, acredita-se que, devido à sua localização nos complexos de poro nuclear, esteja envolvida no transporte núcleo-citoplasmático (Cronshaw & Matunis, 2003; Huebner *et al.* 2006; Krumbholz *et al.*, 2006). Estudando algumas variantes da ALADIN descritas em pacientes com síndrome do

triplo A, observou-se que esta proteína, quando mutada, pode apresentar-se em regiões ectópicas no citoplasma (Cronshaw & Matunis, 2003; Huebner *et al.* 2006). Krumbholz *et al.* (2006) avaliando a mutação Q15K na proteína ALADIN, notaram que, apesar desta mutação não acarretar localização ectópica desta proteína, pode culminar com alterações funcionais desta proteína, ratificando os achados de Cronshaw & Matunis (2003), em que pelo menos os primeiros 47 aminoácidos desta proteína não estão envolvidos com a localização da ALADIN nos complexos de poro nuclear, mas provavelmente são críticos para a interação da ALADIN com outra(s) proteína(s) essencial(is) para sua função.

Baseado em análises microscópicas de células de pacientes com síndrome do triplo A, nenhuma alteração morfológica pôde ser observada no núcleo, no envelope nuclear ou nos complexos de poro nuclear, sugerindo que as mutações encontradas no gene *AAAS* acarretam anormalidade funcional e não estrutural nos complexos de poro nuclear, onde se encontra a proteína ALADIN (Cronshaw & Matunis, 2003).

Estudo realizado por Storr *et al.*, (2005) mostrou expressão aumentada de RNAm de *AAAS* no córtex adrenal e no sistema nervoso central, sendo mais pronunciada no córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e em núcleos associados à atividade motora, incluindo núcleo do nervo craniano e corno ventral da medula espinhal. Este estudo de expressão confirma a participação da proteína ALADIN tanto na adrenal como sua função no sistema nervoso central, o que vai de encontro com os achados clínicos da síndrome do triplo A, envolvendo diferentes sistemas. A proteína ALADIN faz parte da família de proteínas com repetições de triptofano e aspartato (*WD repeat protein*), a qual possui uma grande variedade funcional incluindo interações entre proteínas, tradução de sinais, processamento de RNA,

tráfego vesicular, estrutura do citoesqueleto e controle da divisão celular (Houlden *et al.*, 2002). A variabilidade da gravidade da doença (Metherell *et al.*, 2006) pode estar relacionada com diferentes tipos de mutações em diferentes regiões do gene, podendo também ser consequência de fatores adicionais envolvidos na patogênese desta doença (Huebner *et al.*, 2006).

A correlação entre fenótipo da síndrome do triplo A e o genótipo (mutações no gene *AAAS*) não está bem estabelecida, contudo, pacientes com mutações do gene *AAAS* que levam à formação de um códon de parada precoce parecem apresentar um fenótipo mais grave, provavelmente, em consequência da perda de função da proteína truncada (Houlden *et al.*, 2002). Assim, os achados clínicos de maior gravidade da paciente 3, que apresenta a mutação g.782-783delTG estão de acordo com a literatura.

A análise molecular dos pacientes 4 e 5 não mostrou nenhuma mutação nos genes *MC2R*, *MRAP* e *AAAS*. Este resultado vem ao encontro de estudos prévios em que mais de 50% dos pacientes com DGF têm causa genética desconhecida até o presente momento (Metherell *et al.*, 2006). Recentemente, foi demonstrado que o *MC2R* interage com a Nup50, uma proteína do complexo de poro nuclear (Fan *et al.*, 1997), sugerindo que esta interação seja um novo mecanismo de ação do receptor do ACTH (Doufexis *et al.*, 2007). A participação de mutações da Nup50 como causa da DGF ainda precisa ser estabelecida.

Nossos resultados da análise molecular da região promotora do gene *MC2R* revelaram três alterações distintas tanto nos pacientes como em indivíduos controles, envolvendo os nucleotídeos -694, -759 e -790/-791. Mesmo não sendo usual associar mutações na região promotora de genes como causa de doenças humanas, polimorfismos em regiões promotoras de diferentes genes têm sido



descritos como possíveis causas de doenças, como a síndrome de Von Hippel-Lindau (Muscarella *et al.*, 2007), esclerose sistêmica (Balbi *et al.*, 2007) e esclerose amiotrófica lateral (Dierick *et al.*, 2007).

Slawik *et al.* (2004) descreveram o polimorfismo CTC ou CCC na região promotora do gene *MC2R*, em seu sítio de início da transcrição, e observaram maior relação ACTH/cortisol em resposta ao estímulo com fator liberador de corticotrofina em indivíduos sadios homocigotos CCC/CCC, sugerindo uma redução da sensibilidade ao ACTH nesses indivíduos. Utilizando estudo *in vitro*, Slawik *et al.* (2004) demonstraram também que a expressão de vetores contendo região promotora do *MC2R* com a seqüência CCC resulta em menor atividade promotora, quando comparada à seqüência CTC. Esses dados sugerem que a atividade da região promotora do *MC2R* pode ser afetada por polimorfismos desta região. Naville *et al.* (1997) caracterizaram a presença de elementos responsivos a fatores de transcrição gênica na região promotora do *MC2R* humano, como AP1 e CRE. No entanto, as substituições por nós encontradas não se localizam nas regiões responsivas descritas até o presente momento e são distintas daquela descrita por Slawik *et al.* (2004). Assim, as alterações que encontramos na região promotora do *MC2R* sugerem uma possibilidade de polimorfismo deste gene, cuja repercussão funcional necessita ser elucidada.

**CONCLUSÕES**

1. Observamos que a síndrome de resistência ao ACTH é geneticamente heterogênea e pode acometer os indivíduos de diferentes formas. Descrevemos mutações dos genes *MC2R*, *MRAP* e *AAAS* em segregação com esta síndrome.

2. Os resultados funcionais comprovam a perda de função decorrente da mutação p.Gly116Val no gene *MC2R*, evidenciada pela diminuição da geração de AMPc ao estímulo com ACTH, em células Y6 transfectadas com o *MC2R* normal e a variante p.Gly116Val.

3. As substituições que encontramos na região promotora do *MC2R* sugerem uma possibilidade de polimorfismo. Contudo, estudos futuros desta região precisam ser realizados para que se esclareçam suas implicações funcionais.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

ADAN, R. A.; GISPEN, W. H. Brain melanocortin receptors: from cloning to function. **Peptides**, v.18, p.1279-1287, 1997.

ALLGROVE, J.; CLAYDEN, G. S.; GRANT, D. B.; MACAULAY, J. C. Familial glucocorticoid deficiency with achalasia of the cardia and deficient tear production. **Lancet**, p.1284-1286, 1978.

AMRI, H.; OGWUEGBU, S. O.; BOUJRAD, N.; DRIEU, K.; PAPADOPOULOS, V. *In vivo* regulation of peripheral-type benzodiazepine receptor and glucocorticoid synthesis by Ginkgo biloba extract EGb 761 and isolated ginkgolides. **Endocrinology**, v.137, p.5707–5718, 1996.

BAIG, A. H.; SWORDS, F. M.; NOON, L.A.; KING, P. J.; HUNYADY, L.; CLARK, A. J. Desensitization of the Y1 cell adrenocorticotropin receptor: evidence for a restricted heterologous mechanism implying a role for receptor-effector complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p.44792-44797, 2001.

BALBI, G.; FERREIRA, F.; RIZZI, M.; PICCIOLI, P.; MORABITO, A.; CARDAMONE, L.; GHIO, M.; PALMISANO, G. L.; CARRARA, P.; PEDEMONTE, S.; SESSAREGO, M.; DE ANGIOLETTI, M.; NOTARO, R.; INDIVERI, F.; PISTILLO, M. P. Association of -318 C/T and +49 A/G cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms with a clinical subset of Italian patients with systemic sclerosis. **Clinical and Experimental Immunology**, v.149, p.40-47, 2007.

BALDWIN, J. M. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. **The EMBO Journal**, v.12, p.1693-1703, 1993.

BALDWIN, J. M. Structure and function of receptors coupled to G proteins. **Current Opinion in Cell Biology**, v.6, p.180-190, 1994.

BAYLIS, P. H. Vasopressin and its neurophysin. In: DeGroot LJ, Besser M, Burger HG, Jameson JL, Loriaux DL, Marshall JC, Odell WD, Potts Jr JT, Rubenstein AH (eds) **Endocrinology** W.B. Saunders Co, Philadelphia, p. 406–420, 1991.

BAYWATER, R. P.; THOMAS, D.; VRIEND, G. A sequence and structural study transmembrane helices. **Journal of Computer – Aided Molecular Design**, v.15, p.533-552, 2001.

BERIS, P.; DARBELLAY, R.; SPEISER, D.; KIRCHNER, V.; MIESCHER, P. A. De novo initiation codon mutation (ATG-->ACG) of the beta-globin gene causing beta-thalassemia in a Swiss family. **American Journal of Hematology**, v.42, p.248-253, 1993.

BIRNBAUMER, M.; ANTARAMIAN, A.; THEMME, A. P.; GILBERT, S. Desensitization of the human V2 vasopressin receptor. Homologous effects in the absence of heterologous desensitization. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, p.11783-11788, 1992.

BOURNE, H. R.; SANDERS, D. A.; MCCORMICK, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. **Nature**, v.348, p.125-132, 1990.

BOURNE, H. R.; SANDERS, D. A.; MCCORMICK, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. **Nature**, v.349, p.117-127, 1991.

BROOKS, B. P.; KLETA, R.; STUART, C.; TUCHMAN, M.; JEONG, A.; STERGIOPOULOS, S. G.; BEI, T.; BJORNSON, B.; RUSSELL, L.; CHANOINE, J-P.; TSAGARAKIS, S.; KALSNER, L. R.; STRATAKIS, C. A. Genotypic heterogeneity and clinical phenotype in triple A syndrome: a review of the NIH experience 2000–2005. **Clinical Genetics**, v.68, p.215–221, 2005.

CHELIKANI, P.; HORNAK, V.; EILERS, M.; REEVES, P. J.; SMITH, S. O.; RAJBHANDARY, U. L.; KHORANA, H. G. Role of group-conserved residues in the helical core of  $\beta$ 2-adrenergic receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, p.7027-7032, 2007.

CHEN, C. H.; ASTRIN, K. H.; LEE, G.; ANDERSON, K. E.; DESNICK, R. J. Acute intermittent porphyria: identification and expression of exonic mutations in the hydroxymethylbilane synthase gene. An initiation codon missense mutation in the housekeeping transcript causes "variant acute intermittent porphyria" with normal expression of the erythroid-specific enzyme. **Journal of Clinical Investigation**, v.94, p.1927-1937, 1994.

CHEN, W.; KELLY, M. A.; OPITZ-ARAYA, X.; THOMAS, R. E.; LOW, M. J.; CONE, R. D. Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. **Cell**, v.91, p.789-798, 1997.

CLARK, A. J.; MCLOUGHLIN, L.; GROSSMAN, A. Familial glucocorticoid deficiency associated with point mutation in the adrenocorticotropin receptor. **Lancet**, v.341, p.461-462, 1993.

CLARK, A.; CAMMAS, F. M. The ACTH receptor. **Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.10, p.29-47, 1996.

CLARK, A. J.; WEBER, A. Adrenocorticotropin insensitivity syndromes. **Endocrine Reviews**, v.19, p.828-843, 1998.

CLEMENS, J. W.; LALA, D. S.; PARKER, K. L.; RICHARDS, J. S. Steroidogenic factor-1 binding and transcriptional activity of the cholesterol sidechain cleavage promoter in rat granulosa cells. **Endocrinology**, v.134, p.1499-1508, 1994.

CLEMENTS, J. A.; FUNDER, J. W. Arginine vasopressin (AVP) and AVP-like immunoreactivity in peripheral tissues. **Endocrine Reviews**, v.7, p.449-460, 1986.

CONE, R. D.; LU, D.; KOPPULAS, S.; VAGE, D. I.; KLUNGLAND, H.; BOSTON, B.; CHEN, W.; ORTH, D. N.; POUTON, C.; KESTERSON, R. A. The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. **Recent Progress in Hormone Research**, v.51, p.287-315, 1996.

COTE, M.; PAYET, M. D.; ROUSSEAU, E.; GUILLON, G.; GALLO-PAYET, N. Comparative involvement of cyclic nucleotide phosphodiesterases and adenylyl cyclase on adrenocorticotropin-induced increase of cyclic adenosine monophosphate in rat and human glomerulosa cells. **Endocrinology**, v.140, p.3594-3601, 1999.

CRONSHAW, J. M.; MATUNIS, M. J. The nuclear pore complex protein ALADIN is mislocalized in triple A syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, p.5823-5827, 2003.

CRONSHAW, J. M.; MATUNIS, M. J. The nuclear pore complex: disease associations and functional correlations. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.15, p.34-39, 2004.

DI BLASIO, A. M. ; VOUTILAINEN, R. ; JAFFE, R. B. ; MILLER, W. L. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acids for P450 scc (cholesterol side-chain cleavage enzyme) and P450c17 (17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase) in cultured human fetal adrenal cells. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.65, p.170–175, 1987.

DIERICK, I.; IROBI, J.; JANSSENS, S.; THEUNS, J.; LEMMENS, R.; JACOBS, A. ; CORSMIT, E. ; HERSMUS, N. ; BOSCH, L. V. D. ; ROBBERECHT, W.; De JONGHE, P.; VAN BROECKHOVEN, C.; TIMMERMAN, V. Genetic variant in the *HSPB1* promoter region impairs the HSP27 stress response. **Human Mutation**, p.1-11, 2007.

DRAKE, M. T.; SHENOY, S. K.; LEFKOWITZ, R. J. Trafficking of G protein-coupled receptors. **Circulation Research**, v.99, p.570-582, 2006.

DOUFEXIS, M.; STORR, H. L.; KING, P. J.; CLARK, A. J. L. Interaction of the melanocortin 2 receptor with nucleoporin 50: evidence for a novel pathway between a G-protein-coupled receptor and the nucleus. **FASEB Journal**, v.21, p.4095-4100, 2007.

EHRHART-BORNSTEIN, M.; HINSON, J. P.; BORNSTEIN, S. R.; SCHERBAUM, W. A.; VINSON, G. P. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. **Endocrine Reviews**, v.19, p.101-143, 1998.



EILERS, M.; HORNAK, V.; SMITH, S. O.; KONOPKA, J. B. Comparison of Class A and D G Protein-Coupled Receptors: Common Features in Structure and Activation. **Biochemistry**, v.44, p.8959–8975, 2005.

ELIAS, L. L. K.; HUEBNER, A.; PULLINGER, G. D.; MIRTELLA, A.; CLARK, A. J. L. Functional characterization of naturally occurring mutations of the human adrenocorticotropin receptor: poor correlation of phenotype and genotype. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.84, p. 2766-2770, 1999.

ELIAS, L. L. K.; HUEBNER, A.; METHERELL, L. A.; CANAS, A.; WARNES, G. L.; BITTIS, M. L. M.; CIANFARANIS, S.; CLAYTON, P.E.; SAVAGE, M. O.; CLARK, A. J. L. Tall stature in familial glucocorticoid deficiency. **Clinical Endocrinology**, v.53, p.423-430, 2000.

ELIAS, L. L. K.; FERNANDES-ROSA, F. L.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CASTRO, M. Fisiologia da glândula adrenal. In: **Fisiologia / Margarida de Mello Aires**, 3.<sup>a</sup> edição. Editora Guanabara Koogan, RJ, p.1015-1031, 2008.

FAN, F.; LIU, C. P.; KOROBOVA, O.; HEYTING, C.; OFFENBERG, H. H.; TRUMP, G.; ARNHEIM, N. cDNA cloning and characterization of Npap60: a novel rat nuclear pore-associated protein with an unusual subcellular localization during male germ cell differentiation. **Genomics**, v. 40, p.444-53, 1997.

FLÜCK, C. E.; MARTENS, J. W.; CONTE, F. A.; MILLER, W. L. Clinical, genetic, and functional characterization of adrenocorticotropin receptor mutations using a novel receptor assay. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.87, p.4318-4323, 2002.

FREDHOLM, B. B.; HOKFELT, T.; MILLIGAN, G. G-protein-coupled receptors: an update. **Acta Physiologica**, v.190, p.3-7, 2007.

GALLO-PAYET, N.; GUILLON, G. Regulation of adrenocortical function by vasopressin. **Hormone and Metabolic Research**, v.30, p.360-367, 1998.

GANTZ, I.; TASHIRO, T.; BARCROFT, C.; KONDA, Y.; SHIMOTO, Y.; MIWA, H.; GLOVER, T.; MUNZERT, G.; YAMADA, T. Localization of the genes encoding the melanocortin-2 (adrenocorticotropin hormone) and melanocortin-3 receptors to chromosomes 18p11.2 and 20q13.3 by fluorescence in situ hybridization. **Genomics**, v.18, p.166-167, 1993.

GAZARIAN, M.; COWELL, C. T.; BONNEY, M.; GRIGOR, W. G. The "4A" syndrome: adrenocortical insufficiency associated with achalasia, alacrima, autonomic and other neurological abnormalities. **European Journal of Pediatrics**, v. 154, p.18-23, 1995.

GROSSMAN, A. Corticotropin-releasing hormone: basic physiology and clinical applications. In: DeGroot LJ, Besser GM, Burger HG, Jameson JL, Loriaux DL, Marshall JC, Odell WD, Potts Jr JT, Rubenstein AH (eds) **Endocrinology**. W.B. Saunders Co, Philadelphia, p.341–354, 1999.

HAMM, H. E. How activated receptors couple to G proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, p.4819-4821, 2001.

HANDSCHUG, K.; SPERLING, S.; YOON, S. J.; HENNIG, S.; CLARK, A. J.; HUEBNER, A. Triple A syndrome is caused by mutations in AAAS, a new WD-repeat protein gene. **Human Molecular Genetics**, v.10, p.283-290, 2001.

HAYASHI, Y.; KAMIJO, T.; YAMAMOTO, M.; PHILLIPS, J. A. 3<sup>RD</sup>.; OGAWA, M.; SEO, H. A case with isolated growth hormone deficiency caused by compound heterozygous mutation in GH-1: a novel mutation in the initiation codon and 7.6kb deletion. **Growth Hormone & IGF Research**, v.17, p.249-253, 2007.

HIROI, N.; YAKUSHIJI, F.; SHIMOJO, M.; WATANABE, S.; SUGANO, S.; YAMAGUCHI, N.; MIYACHI, Y. Human ACTH hypersensitivity syndrome associated with abnormalities of the ACTH receptor gene. **Clinical Endocrinology**, v.48, p.129-134, 1998.

HOULDEN, H.; SMITH, S.; DE CARVALHO, M.; BLAKE, J.; MATHIAS, C.; WOOD, N. W.; REILLY, M. M. Clinical and genetic characterization of families with triple A (Allgrove) syndrome. **Brain**, v.125, p.2681–2690, 2002.

HUEBNER, A.; ELIAS, L. L.; CLARK, A. J. ACTH resistance syndromes. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v.1, p.277-293, 1999.

HUEBNER, A.; YOON, S. J.; OZKINAY, F.; HILSCHER, C.; LEE, H.; CLARK, A. J.; HANDSCHUG, K. Triple A syndrome--clinical aspects and molecular genetics. **Endocrine Research**, v.26, p.751-759, 2000.

HUEBNER, A.; MANN, P.; ROHDE, E.; KAINDL, A. M.; WITT, M.; VERKADE, P.; JAKUBICZKA, S.; MENSCHIKOWSKI, M.; STOLTENBURG-DIDIGER, G.; KOEHLER, K. Mice lacking the nuclear pore complex protein ALADIN show female infertility but fail to develop a phenotype resembling human triple A syndrome. **Molecular and Cellular Biology**, v.26, p.1879-1887, 2006.

IMAI T, SEO H, MURATA Y, OHNO M, SATOH Y, FUNAHASHI H, TAKAGI H, MATSUI N. Alteration in the expression of genes for cholesterol side-chain cleavage enzyme and 21-hydroxylase by hypophysectomy and ACTH administration in the rat adrenal. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.4, p.239-245, 1990a.

IMAI, T.; SEO, H.; MURATA, Y.; OHNO, M.; SATOH, Y.; FUNAHASHI, H.; TAKAGI, H.; MATSUI, N. Adrenocorticotropin increases expression of c-fos and beta-actin genes in the rat adrenals. **Endocrinology**, v.127, p.1742-1747, 1990b.

KOLAKOWSKI, L. F. Jr. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. **Receptor Channels**, v.2, p.1-7, 1994.

KOZAK, M. Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eukaryotic cell-free translation systems. **Molecular and Cellular Biology**, v.9, p.5073-5080, 1989.

KRUMBHOLZ, M.; KOEHLER, K.; HUEBNER, A. Cellular localization of 17 natural mutant variants of ALADIN protein in triple A syndrome - shedding light on an unexpected splice mutation. **Biochemistry and Cell Biology**, v.84, p.243-249, 2006.

LACROIX, A.; N'DIAYE, N.; TREMBLAY, J.; HAMET, P. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. **Endocrine Reviews**, v.22, p.75-110, 2001.

LEHOUX, J. G.; FLEURY, A.; DUCHARME, L. The acute and chronic effects of adrenocorticotropin on the levels of messenger ribonucleic acid and protein of steroidogenic enzymes in rat adrenal in vivo. **Endocrinology**, v.139, p.3913-3922, 1998.

LIU, W.; EILERS, M.; PATEL, A. B.; SMITH, S. O. Helix packing moments reveal diversity and conservation in membrane protein structure. **Journal of Molecular Biology**, v.337, p.713-729, 2004.

METHERELL, L. A.; CHAPPLE, J. P.; COORAY, S.; DAVID, A.; BECKER, C.; RUSCHENDORF, F.; NAVILLE, D.; BEGEOT, M.; KHOO, B.; NURNBERG, P.; HUEBNER, A.; CHEETHAM, M. E.; CLARK, A. J. Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. **Nature Genetics**, v.37, p.166-170, 2005.

METHERELL, L. A.; CHAN, L. F.; CLARK, A. J. The genetics of ACTH resistance syndromes. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.20, p.547-560, 2006.

MILLER, W L. Molecular biology of steroid hormone synthesis. **Endocrine Reviews**, v.9, p.295-318, 1988.

MOR, F.; GREEN, P.; WYSENBEEK, A. J. Myopathy in Addison's disease. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.46, p.81-83, 1987.

MOROHASHI, K.; ZANGER, U. M.; HONDA, S.; HARA, M.; WATERMAN, M. R.; OMURA, T. Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. **Molecular Endocrinology**, v.7, p.1196–1204, 1993.

MOUNTJOY, K. G.; ROBBINS, L. S.; MORTRUD, M. T.; CONE, R. D. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. **Science**, v.257, p.1248-1251, 1992.

MOUNTJOY, K. G.; BIRD, I. M.; RAINEY, W. E.; CONE, R. D. ACTH induces up-regulation of ACTH receptor mRNA in mouse and human adrenocortical cell lines. **Molecular and Cellular Endocrinology** v.99, p.R17-20, 1994.

MUSCARELLA, L. A.; BARBANO, R.; AUGELLO, B.; FORMICA, V.; MICALÈ, L.; ZELANTE, L.; DÀGRUMA, L.; MERLA, G. Na 11-bp duplication in the promoter region of the VHL gene in a patient with cerebellar hemangioblastoma and renal oncocytoma. **Journal of Human Genetics**, v.52, p.485-491, 2007.

NAVILLE, D.; BARJHOUX, L.; JAILLARD, C.; FAURY, D.; DESPERT, F.; ESTEVA, B.; DURAND, P.; SAEZ, J. M.; BEGEOT, M. Demonstration by transfection studies that mutations in the adrenocorticotropin receptor gene are one cause of the hereditary syndrome of glucocorticoid deficiency. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.81, p.1442-1448, 1996.

NAVILLE, D.; JAILLARD, C.; BARJHOUX, L.; DURAND, P.; BEGEOT, M. Genomic structure and promoter characterization of the human ACTH receptor gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.230, p.7-12, 1997.

NEDOSZYTKO, B.; SZCZERKOWSKA-DOBOSZ, A.; ZABLOTNA, M.; GLEN, J.; REBALA, K.; ROSZKIEWICZ, J. Association of promoter polymorphism in the tumour necrosis factor-alpha gene and early-onset psoriasis vulgaris in a northern Polish population. **British Journal of Dermatology**, v.157, p.165-167, 2007.

OBER, C.; ALDRICH, C. L.; CHERVONEVA, I.; BILLSTRAND, C.; RAHIMOV, F.; GRAY, H. L.; HYSLOP, T. Variation in the *HLA-G* promoter region influences miscarriage rates. **American Journal of Human Genetics**, v.72, p.1425-1435, 2003.

PAPADOPOULOS, V. Structure and function of the peripheral type benzodiazepine receptor in steroidogenic cells. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.217, p.130–142, 1998.

PARKER, K. L.; SCHIMMER, B. P. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. **Endocrine Reviews**, v.18, p.361–377, 1997.

PENHOAT, A.; NAVILLE, D.; EL MOURABIT, H.; BURONFOSSE, A.; BERBEROGLU, M.; OCAL, G.; TSIGOS, C.; DURAND, P.; BEGEOT, M. Functional relationships between three novel homozygous mutations in the ACTH receptor gene and familial glucocorticoid deficiency. **Journal of Molecular Medicine**, v.80, p.406-411, 2002.

PROBST, W. C. ; SNYDER, L. A. ; SCHUSTER, D. I.; BROSIUS, J.; SEALFON, S. C. Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. **DNA and Cell Biology**, v.11, p.1-20, 1992.

PRPIC, I.; HUEBNER, A.; PERSIC, M.; HANDSCHUG, K.; PAVLETIC, M. Triple A syndrome: genotype-phenotype assessment. **Clinical Genetics**, v.63, p.415-417, 2003.

RAINEY, W. E.; SANER, K.; SCHIMMER, B. P. Adrenocortical cell lines. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.228, p.23-38, 2004.

REIMANN, K.; BECKER, L.; STRUWE, H.; RUBBEN, H.; EISENHARDT, A.; SIFFERT, W. Insertion/deletion polymorphism in the promoter of NFkB1 as a potential molecular marker for the risk of recurrence in superficial bladder cancer. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.45, p.423-430, 2007.

ROY, S.; RACHED, M.; GALLO-PAYET, N. Differential regulation of the human adrenocorticotropin receptor [melanocortin-2 receptor (MC2R)] by human MC2R accessory protein isoforms alpha and beta in isogenic human embryonic kidney 293 cells. **Molecular Endocrinology**, v.21, p.1656-1669, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS: minipreparation. In: **Molecular Cloning**, 3.<sup>a</sup> edição. Editora Cold spring Harbor Laboratory Press, NY, p.1.32-1.33, 2001.

SCHIMMER, B. P.; KWAN, W. K.; TSAO, J.; QIU, R. Adrenocorticotropin-resistant mutants of the Y1 adrenal cell line fail to express the adrenocorticotropin receptor. **Journal of Cellular Physiology**, v.163, p.164-171, 1995.

SHEPARD, T. H.; LANDING, B. H.; MASON, D. G. Familial Addison's disease; case reports of two sisters with corticoid deficiency unassociated with hypoaldosteronism. **A.M.A. Journal of Diseases of Children**, v.97, p.154-162, 1959.

SIMPSON, E. R.; WATERMAN, M. R. Regulation of the synthesis steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. **Annual Review of Physiology**, v.50, p.427-440, 1988.

SLAWIK, M.; REISCH, N.; ZWERMANN, O.; MASER-GLUTH, C.; STAHL, M.; KLINK, A.; REINCKE, M.; BEUSCHLEIN, F. Characterization of an adrenocorticotropin (ACTH) receptor promoter polymorphism leading to decreased adrenal responsiveness to ACTH. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.89, p.3131-3137, 2004.

SLAVOTINEK, A. M.; HURST, J. A.; DUNGER, D.; WILKIE, A. O. ACTH receptor mutation in a girl with familial glucocorticoid deficiency. **Clinical Genetics**, v.53, p.57-62, 1998.

SPRANG, S. R. G protein mechanisms: insights from structural analysis. **Annual Review of Biochemistry**, v.66, p.639-678, 1997.

STOCCO, D. M.; CLARK, B. J. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. **Endocrine Reviews**, v.17, p.221–244, 1996.

STORR, H. L.; CLARK, A. J.; PRIESTLEY, J. V.; MICHAEL, G. J. Identification of the sites of expression of triple A syndrome mRNA in the rat using in situ hybridisation. **Neuroscience**, v.131, p.113-123, 2005.

STRADER, C. D.; FONG, T. M.; TOTA, M. R.; UNDERWOOD, D.; DIXON, R. A. Structure and function of G protein-coupled receptors. **Annual Review of Biochemistry**, v.63, p.101-132, 1994.

SUGAWARA, T.; KIRIAKIDOU, M.; MCALLISTER, J. M.; HOLT, J. A.; ARAKANE, F.; STRAUSS III, J. F. Regulation of expression of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: a central role for steroidogenic factor 1. **Steroids**, v.62, p.5–9, 1997.

SWORDS, F. M.; NOON, L. A.; KING, P. J.; CLARK, A. J. Constitutive activation of the human ACTH receptor resulting from a synergistic interaction between two naturally occurring missense mutations in the MC2R gene. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.213, p.149-154, 2004.

TAKAYAMA, K.; MOROHASHI, K.; HONDA, S.; HARA, N.; OMURA, T. Contribution of Ad4BP, a steroidogenic cell-specific transcription factor, to regulation of the human CYP11A and bovine CYP11B genes through their distal promoters. **Journal of Biochemistry**, v.116, p.193–203, 1994.

TSIGOS, C.; ARAI, K.; HUNG, W.; CHROUSOS, G. P. Hereditary isolated glucocorticoid deficiency is associated with abnormalities of the adrenocorticotropin receptor gene. **Journal of Clinical Investigation**, v.92, p.2458-2461, 1993.

TSIGOS, C.; ARAI, K.; LATRONICO, A. C.; DIGEORGE, A. M.; RAPAPORT, R.; CHROUSOS, G. P. A novel mutation of the adrenocorticotropin receptor (ACTH-R) gene in a family with the syndrome of isolated glucocorticoid deficiency, but no



ACTH-R abnormalities in two families with the triple A syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.80, p.2186-2189, 1995.

TSIGOS, C.; TSIOTRA, P.; GARIBALDI, L. R.; STAVRIDIS, J. C.; CHROUSOS, G. P.; RAPTIS, S. A. Mutations of the ACTH receptor gene in a new family with isolated glucocorticoid deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.71, p.646-650, 2000.

TULLIO-PELET, A.; SALOMON, R.; HADJ-RABIA, S.; MUGNIER, C.; DE LAET, M. H.; CHAOUACHI, B.; BAKIRI, F.; BROTTIER, P.; CATTOLICO, L.; PENET, C.; BEGEOT, M.; NAVILLE, D.; NICOLINO, M.; CHAUSSAIN, J. L.; WEISSENBACH, J.; MUNNICH, A.; LYONNET, S. Mutant WD-repeat protein in triple-A syndrome. **Nature Genetics**, v.26, p.332-335, 2000.

TURNBULL, A. V.; RIVIER, C. L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. **Physiological Reviews**, v.79, p.1-71, 1999.

VAN BIESEN, T.; LUTTRELL, L. M.; HAWES, B. E.; LEFKOWITZ, R. J. Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. **Endocrine Reviews**, v.17, p.698-714, 1996.

WATANABE, N.; INOUE, H.; FUJII-KURIYAMA, Y. Regulatory mechanisms of cAMP-dependent and cell-specific expression of human steroidogenic cytochrome P450 scc (CYP11A1) gene. **European Journal of Biochemistry**, v.222, p.825-834, 1994.

WAYE, J. S.; ENG, B.; PATTERSON, M.; BARR, R. D.; CHUI, D. H. De novo mutation of the beta-globin gene initiation codon (ATG-->AAG) in a Northern European boy. **American Journal of Hematology**, v.56, p.179-182, 1997.

WEBER, A.; KAPAS, S.; HINSON, J.; GRANT, D. B.; GROSSMAN, A.; CLARK, A. J. L. Functional characterization of the cloned human ACTH receptor: impaired responsiveness of mutant receptor in familial glucocorticoid deficiency. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.197, p.172-172, 1993.

WEBER, A.; CLARK, A. J. L. Mutations of the ACTH receptor gene are only cause of familial glucocorticoid deficiency. **Human Molecular Genetics**, v.3, p.585-588, 1994.

WEBER, A.; TOPPARI, J.; HARVEY, R. D.; KLANN, R. C.; SHAW, N. J.; RICKER, A. T.; NANTO-SALONEN, K.; BEVAN, J. S.; CLARK, A. J. L. Adrenocorticotropin receptor gene mutations in familial glucocorticoid deficiency: relationship with clinical features in four families. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.80, p.65-71, 1995.

WILLIAMS, G.; BING, C.; CAI, X. J.; HARROLD, J. A.; KING, P. J.; LIU, X. H. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. **Physiology & Behavior**, v.74, p.683-701, 2001.

WU, S-M.; STRATAKIS, C. A.; CHAN, C. H. Y.; HALLERMEIER, K. M.; BOURDONY, C. J.; RENNERT, O. M.; CHAN, W. Y. Genetic heterogeneity of adrenocorticotropin (ACTH) resistance syndrom: identification of a novel mutation of the ACTH: identification of a novel mutation of the ACTH receptor gene in hereditary glucocorticoid deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.64, p.256-265, 1998.

YASUDA, G.; UMEMURA, S.; JEFFRIES, W.B. Effect of epinephrine on cAMP accumulation in cultured rat inner medullary collecting duct cells. **American Journal of Physiology**, v.272, p.192-197, 1997.

YU, X. H.; ZHAO, T. Q.; WANG, L.; LIU, Z. P.; ZHANG, C. M.; CHEN, R.; LI, L.; LIU, G.; HU, W. C. A novel substitution at the translation initiator codon (ATG-->ATC) of the lipoprotein lipase gene is mainly responsible for lipoprotein lipase deficiency in a patient with severe hypertriglyceridemia and recurrent pancreatitis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.341, p.82-87, 2006.

ZHANG, P.; MELLON, S. H. Multiple orphan nuclear receptors converge to regulate rat P450c17 gene transcription: novel mechanisms for orphan nuclear receptor action. **Molecular Endocrinology**, v.11, p.891-904, 1997.



## ANEXO 1

### Protocolo de extração de DNA

- 1) Pipetou-se 200  $\mu$ L da amostra em um tubo microtubo estéril de 1.5 mL.
- 2) Adicionou-se ao tubo 20  $\mu$ L do QIAGEN Protease ou solução estoque de Proteinase K e 200  $\mu$ L do tampão AL. Agitou-se no vortex por 15 segundos.
- 3) Incubou-se a 56°C por 10 minutos.
- 4) Adicionou-se 200  $\mu$ L de etanol 96-100% ao tubo e agitou-se novamente.
- 5) A amostra foi transferida para a coluna *QIAamp spin column*, que estava acoplada a um tubo de coleta, centrifugada a 6000g (8500 rpm) por 1 minuto e o tubo de coleta contendo o filtrado foi descartado.
- 6) Cuidadosamente, adicionou-se 500  $\mu$ L do tampão AW1 na *QIAamp spin column* que estava acoplada a outro tubo de coleta e centrifugou-se a 6000g (8500 rpm) por 1 minuto. Descartou-se o tubo de coleta contendo o filtrado.
- 7) A seguir, adicionou-se mais 500  $\mu$ L do tampão AW2 na *QIAamp spin column*. Centrifugou-se na rotação de 9000g (13200 rpm) por 3 minutos e descartou-se o tubo de coleta contendo o filtrado.
- 8) A *QIAamp spin column* foi acoplada em outro tubo microtubo de 1.5 mL estéril.
- 9) Foram adicionados 200  $\mu$ L do tampão AE na *QIAamp spin column* e incubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos, seguindo-se uma centrifugação a 6000g (8500 rpm) por 1 minuto. O filtrado, contendo o DNA extraído foi estocado e mantido a -20°C, até o momento da realização da PCR.

### Protocolo de preparação do gel de agarose 1%:

- 1 g de agarose
- 100 mL de Tampão TAE 1X\*
- 5  $\mu$ L Brometo de Etídeo 10 mg/mL.

### Tampão TAE 50X

- Tris base - 242 g
- Ácido Acético Glacial - 57,1 mL
- EDTA (0,5 M; pH = 8,0) - 100 mL
- Água Destilada – 1 L

## ANEXO 2

Tabela 4 - Quantidades específicas de cada um dos reagentes utilizados nas reações de PCRs.

Gene	exon	Iniciador sense (10 $\mu$ M)	Iniciador antisense (10 $\mu$ M)	Tampão 10X	MgCl <sub>2</sub> (50mM)	dNTP (10mM)	Taq (5U/ $\mu$ L)	DNA	DMSO
<b>MC2R (codificadora)</b>	2	3 $\mu$ L	6 $\mu$ L	5 $\mu$ L	1,5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	-----
<b>MC2R (promotora)</b>		2,5 $\mu$ L	2,5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	2 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	-----
<b>MRAP</b>	3	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	1,5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
	4	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	5 $\mu$ L	2 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
	5	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	1,5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
	6	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	1,5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
<b>AAAS</b>	1 a 16	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	1,5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	-----

**Protocolo de purificação com isopropanol 75%:**

- 1) Adicionou-se à reação de sequenciamento 80  $\mu$ l de isopropanol 75%;
- 2) Agitou-se em vórtex;
- 3) Incubou-se em temperatura ambiente por 15 minutos;
- 4) Centrifugou-se em velocidade máxima por 20 minutos;
- 5) O sobrenadante foi aspirado e descartado;
- 6) Adicionou-se 250  $\mu$ l de isopropanol 75% e agitou-se em vórtex;
- 7) Centrifugou-se novamente em velocidade máxima por 5 minutos;
- 8) Aspirou-se o sobrenadante;
- 9) O tubo contendo o precipitado foi deixado a 90°C por 1 minuto para secagem.

**ANEXO 3****Meio LB (Luria-Betani)**

1,0% triptona

0,5% extrato de levedura

1,0% NaCl

pH 7,0

**Meio TY (Tryptona e extrato de levedura)**

20 g/L de triptona

5 g/L de extrato de levedura

5 g/L de NaCl

pH 7,0

**Meio SOB (100 mL)**

Triptona – 2 g

Extrato de Levedura – 0,5 g

NaCl – 0,05 g

pH 7,0

**Meio SOC (100 mL)**

Para 10 mL de SOB adicionar:

Glicose 1M – 2 mL

MgCl<sub>2</sub> 1M – 100 µL

## ANEXO 4

### ***E. coli* eletrocompetentes**

- 1) Colônias de bactérias *E. coli* crescidas em meio LB (Luria-Betani) agar foram cultivadas em meio Ty foram inoculadas e deixadas para crescimento por 16 horas (*overnight*).
- 2) As bactérias *E. coli* foram plaqueadas em meio LB (Luria-Betani) agar e deixadas para crescimento por 16 horas (*overnight*).
- 3) No dia seguinte, foi preparado o inóculo com meio Ty (Tryptona e Extrato de levedura) e inoculamos 1 colônia de *E. coli* a 37°C a 180 rpm por 16 horas.
- 4) Após este período, inoculou-se 1,2 mL de cultura em 300 mL de meio Ty. Incubou-se em temperatura ambiente por 3 horas. A seguir, as células foram transferidas para 6 tubos de 50 mL e deixadas no gelo por 15 minutos.
- 5) Centrifugou-se a 0°C por 5 minutos a 5000 rpm. Desprezou-se o sobrenadante.
- 6) Ressuspendeu-se o precipitado em 50 mL de água milliQ estéril gelada, e seguiram-se a agitação em vórtex, centrifugação e retirada do sobrenadante.
- 7) Ressuspendeu-se o precipitado em 30 mL de água milliQ estéril gelada, seguido de agitação, centrifugação e eliminação do sobrenadante. O conteúdo total foi agrupado em dois tubos.
- 8) Ressuspendeu-se o precipitado em 50 mL de água milliQ estéril gelada, e mais uma vez, seguiram-se as etapas de agitação, centrifugação e descarte do sobrenadante. O conteúdo foi reunido em um único tubo.
- 9) Em seguida, lavou-se o conteúdo com 25 mL de glicerol 10% gelado (diluído em água). Esta lavagem foi seguida de centrifugação e descarte do sobrenadante. Este procedimento foi repetido mais uma vez.
- 10) O conteúdo foi alíquotado e congelado a -80°C (40 µL em cada tubo).

## ANEXO 5

### Extração do DNA plasmidial

- 1) Colocou-se 1,5 mL da cultura (item 8.4) em um microtubo e centrifugou-se em velocidade máxima por 30 segundos a 4°C. A porção original da cultura não utilizada foi estocada a 4°C.
- 2) Após centrifugar, removeu-se o meio por aspiração, deixando o precipitado de bactérias o mais seco possível.
- 3) Este precipitado foi ressuscitado em 100 µL de solução alcalina de lise I (50 mM de glicose, 25 mM de Tris-Cl pH 8,0, 10 mM de EDTA pH 8,0) gelada, sendo agitado em vórtex vigorosamente.
- 4) Adicionou-se 200 µL de solução alcalina de lise II (0,2 N NaOH, 1% SDS) à suspensão, fechou-se bem os tubos para homogeneizar vertendo-os rapidamente por 5 vezes. Após este procedimento, os tubos foram deixados no gelo.
- 5) Prosseguiu-se com a adição de 150 µL solução alcalina de lise III (5 M de acetato de potássio, ácido glacial acético, H<sub>2</sub>O – 28,5 mL) gelada. Os tubos foram novamente fechados e homogeneizados por meio de diversas inversões. Deixou-se no gelo por 3-5 minutos.
- 6) Em seguida, centrifugou-se o lisado em velocidade máxima por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para outro tubo.
- 7) Igual volume de fenol-clorofórmio foi adicionado, seguindo-se a agitação, centrifugação (5 minutos a 4°C) e transferência da fase aquosa para um tubo limpo.
- 8) O ácido nucléico do sobrenadante foi precipitado adicionando-se 2 volumes de etanol à temperatura ambiente. A solução foi misturada em vórtex e deixada em temperatura ambiente por 5 minutos.
- 9) Centrifugou-se a solução da etapa 8 em velocidade máxima por 5 minutos a 4°C.
- 10) O sobrenadante foi removido por aspiração e o tubo deixado invertido sobre papel filtro para secar.



11) Adicionou-se 1 mL de etanol 70% ao precipitado e inverteu-se o tubo fechado por diversas vezes. O DNA foi recuperado por centrifugação em velocidade máxima por 2 minutos a 4°C.

12) Todo o sobrenadante foi removido e o tubo foi deixado aberto em temperatura ambiente até que todo etanol remanescente tivesse evaporado.

13) O DNA foi dissolvido em 25 µL de TE (pH 8.0) e estocado a -20°C.

## ANEXO 6

### Transfecção

- 1) Células Y6 ( $10^6$  células) foram plaqueadas em placas de cultura de 6 poços, em meio de cultura completo (acima descrito), até que atingissem 70-80% de confluência.
- 2) No dia da transfecção, 5  $\mu\text{g}$  de DNA, isto é plasmídeo PCDNA3 contendo MC2R normal e mutante G116V, foi diluído em 100  $\mu\text{L}$  de meio sem soro.
- 3) Em seguida, diluiu-se 30  $\mu\text{L}$  de lipofectina (Invitrogen) em 150  $\mu\text{L}$  de meio sem soro, a qual foi mantida em temperatura ambiente por 45 minutos.
- 4) O DNA plasmidial e a solução de lipofectina foram adicionados em um tubo microtubo, agitados gentilmente e incubados por 15 minutos em temperatura ambiente.
- 5) O meio de cultura foi removido e as células lavadas duas vezes com 2 mL de meio sem soro. Após este procedimento, o meio de lavagem foi aspirado.
- 6) Adicionou-se à mistura da etapa 5 2,7 mL de meio sem soro, misturou-se gentilmente e, em seguida, esta solução foi pipetada na placa contendo as células.
- 7) Incubou-se a  $37^\circ\text{C}$  em estufa de  $\text{CO}_2$  por 10 horas.
- 8) Após as 10 horas de incubação, retirou-se a solução de transfecção e 4 mL de meio de cultura completo foram adicionados.
- 9) Após 72 horas, adicionou-se Geneticina (G418, Invitrogen) na concentração de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- 10) As células transfectadas foram mantidas em cultura, com meio de cultura completo contendo 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Geneticina, com troca do meio a cada 4 dias.
- 11) Após cerca de 20 a 25 dias de cultura, retirou-se o meio e as células foram lavadas duas vezes com meio sem soro. As colônias de células foram tripsinizadas individualmente e transferidas para placa de cultura de 24 poços, com 400  $\mu\text{L}$  de meio de cultura completo contendo G418 (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).
- 12) Após 7 dias, as células foram transferidas para placa de cultura de 6 poços, com 400  $\mu\text{L}$  de meio de cultura completo contendo G418 (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).
- 13) Após 7 dias, com confluência de 80%, as células foram transferidas para frascos de cultura de 25  $\text{cm}^2$ .

14) Os clones de células Y6 transfectadas com pCDNA3 contendo o receptor normal e a variante G116V foram congelados, mantendo-se um dos clones que foi utilizado para a realização do estudo funcional.

## ANEXO 7

### **Protocolo de dosagem de AMPc:** ensaio comercial cAMP Enzymeimmunoassay Biotrak TM (EIA) System (dual range) (Amersham)

- 1) Células cultivadas em placas de 96 poços ( $10^4$  células/poço) por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  com 5%  $\text{CO}_2$  e 95% de umidade foram incubadas por 60 minutos com 20  $\mu\text{l}$  de ACTH [1-24] em concentrações variando de  $10^{-12}$  a  $10^{-6}$  ou incubadas com forskolina  $10^{-5}$  M.
- 2) A seguir, adicionou-se 20  $\mu\text{l}$  de reagente de lise 1 (fornecido pelo ensaio comercial) e incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente.
- 3) Transferiu-se 100  $\mu\text{l}$  do lisado celular para a placa de ensaio.
- 4) Pipetou-se 100  $\mu\text{l}$  do reagente de lise 1B e 100  $\mu\text{l}$  do reagente de lise 2B nos poços NSB (ligação não específica).
- 5) Pipetou-se 100  $\mu\text{l}$  do reagente de lise 1B nos poços zero do padrão.
- 6) Pipetou-se 100  $\mu\text{l}$  de cada padrão nos poços apropriados.
- 7) Pipetou-se 100  $\mu\text{l}$  das amostras desconhecidas nos poços apropriados.
- 8) Pipetou-se 100  $\mu\text{l}$  do anti-soro em todos os poços, exceto nos brancos e NSB.
- 9) Cobriu-se a placa, agitou-se gentilmente e incubou-se  $3-5^{\circ}\text{C}$  por 2 horas.
- 10) Cuidadosamente pipetou-se 50  $\mu\text{l}$  da peroxidase conjugada (*cAMP-peroxidase conjugate*) em todos os poços, exceto nos brancos.
- 11) Cobriu-se a placa, misturou-se gentilmente e incubou-se a  $3-5^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos.
- 12) Aspirou-se e lavou-se todos os poços 4 vezes com 400  $\mu\text{l}$  de tampão de lavagem, vertendo-se a placa em papel absorvente para que qualquer volume residual fosse removido.
- 13) Imediatamente colocou-se 150  $\mu\text{l}$  de substrato enzimático em todos os poços, cobriu-se a placa e misturou-se em agitador de microplaca por 60 minutos em temperatura ambiente ( $15-30^{\circ}\text{C}$ ).
- 14) Pipetou-se 100  $\mu\text{l}$  1.0 M de ácido sulfúrico em cada poço e foi feita a leitura em densidade ótica de 450 nm dentro de 30 minutos.

**ANEXO 8**

Manuscrito aceito para publicação no European Journal of Endocrinology.

## CLINICAL STUDY

# Heterogeneity in the molecular basis of ACTH resistance syndrome

Cristhianna Viesti Advincula Collares<sup>1</sup>, Jose Antunes-Rodrigues<sup>1</sup>, Ayrton Custodio Moreira<sup>2</sup>, Suzana Nesi Franca<sup>3</sup>, Luiz Alberto Pereira<sup>4</sup>, Maria Marta Sarquis Soares<sup>5</sup>, Jorge Elias<sup>2</sup>, Adrian J Clark<sup>6</sup>, Margaret de Castro<sup>2</sup> and Lucila Leico Kagohara Elias<sup>1</sup>

Q1 Departments of <sup>1</sup>Physiology and <sup>2</sup>Internal Medicine, School of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil, <sup>3</sup>Department of Pediatrics, University Hospital, Curitiba, Parana, Brazil, <sup>4</sup>Hospital of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, <sup>5</sup>Department of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil and <sup>6</sup>William Harvey Research Institute, Centre for Endocrinology, Barts and The London, Queen Mary, University of London, London, UK

(Correspondence should be addressed to L L K Elias who is now at Avenida Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil; Email: lleias@fmrp.usp.br)

## Abstract

Q3 **Objective:** ACTH resistance syndromes are rare, autosomal, and genetically heterogeneous diseases that include familial glucocorticoid deficiency (FGD) and triple A syndrome. FGD has been shown to segregate with mutations in the ACTH receptor (*MC2R*) or *MRAP* gene, whereas mutations in the triple A syndrome (*AAAS*, Allgrove syndrome) gene have been found in segregation with triple A syndrome. We describe the clinical findings and molecular analysis of *MC2R*, *MRAP*, and *AAAS* genes in five Brazilian patients with ACTH resistance syndrome.

**Design and methods:** Genomic DNA from patients and their unaffected relatives was extracted from peripheral blood leucocytes and amplified by PCR, followed by automated sequencing. Functional analysis was carried out using Y6 cells expressing wild-type and mutant *MC2R*.

**Results:** All five patients showed low cortisol and elevated plasma ACTH levels. One patient had achalasia and alacrima, besides the symptoms of adrenal insufficiency. The molecular analysis of FGD patients revealed a novel p.Gly116Val mutation in the *MC2R* gene in one patient and p.Met11le mutation in the *MRAP* gene in another patient. Expression of p.Gly116Val *MC2R* mutant in Y6 cells revealed that this variant failed to stimulate cAMP production. The analysis of the *AAAS* gene in the patient with triple A syndrome showed a novel g.782\_783delTGdeletion. The molecular analysis of DNA from other two patients showed no mutation in *MC2R*, *MRAP*, or *AAAS* gene.

**Conclusions:** In conclusion, the molecular basis of ACTH resistance syndrome is heterogeneous, segregating with genes coding for proteins involved with ACTH receptor signaling/expression or adrenal gland development and other unknown genes.

*European Journal of Endocrinology* 159 1–10

## Introduction

Adrenocorticotropin (ACTH) resistance syndromes include familial glucocorticoid deficiency (FGD) and triple A syndrome, also known as Allgrove syndrome (1). These syndromes are rare autosomal recessive disorders characterized by early onset of primary adrenocortical insufficiency (2). FGD was first described by Shepard and colleagues (1959) (3) in two sisters with Addison's disease without mineralocorticoid deficiency. Clinical onset is usually in the first year of life, but it may occur later, and is accompanied by failure to thrive, hypoglycemia, convulsions, and skin pigmentation (2).

FGD is a genetically heterogeneous disease. FGD type 1 (OMIM no. 202200) includes patients with mutation in the ACTH receptor gene (*MC2R*) that accounts for

25% of FGD patients (1). The *MC2R* is a member of the melanocortin receptor family in class A of the seven transmembrane domain G protein-coupled receptors (GPCRs), and signals through the cAMP pathways by stimulating adenylyl cyclase activity. The *MC2R* maps to 18p11.2 and comprises two exons; exon 1 is untranslated and exon 2 encodes the entire sequence for the *MC2R* protein (4). Since the first report of *MC2R* mutation (5), several other mutations in the coding region of this gene have been described in segregation with FGD (for review, see 1).

More recently, mutations in *MRAP*, a gene encoding a small single-transmembrane domain protein known as melanocortin 2 receptor accessory protein, have been described in a subset of patients with ACTH resistance syndrome, comprising FGD type 2 (OMIM no. 607398) (6, 7). Human *MRAP* is located at 21q22.1 and codes

for two MRAP isoforms, MRAP- $\alpha$  and MRAP- $\beta$ , which differentially regulate the function of MC2R (8). MRAP mutations are present in 20% of patients with FGD (6). In more than 50% of FGD patients, there is no known molecular genetic defect. In three of these families, linkage was shown to markers on chromosome 8q (OMIM# 609197), confirming the genetic heterogeneity of the disease (9). The disease linking to chromosome 8q was defined as FGD type 3.

Triple A syndrome (AAAS, Allgrove syndrome, OMIM no. 231550) is a genetic disorder characterized by a triad of adrenal insufficiency, achalasia, and alacrima, first described by Allgrove *et al.* (1978) (10). Patients with triple A syndrome usually present with hypoglycemia due to adrenal insufficiency in the first decade of life but it can become manifest as late as the third decade of life (11). Some patients may have progressive and disabling neurological manifestations due to central, peripheral, or autonomic nervous system involvement (12, 13), often associated with mild mental retardation (11). Genetic linkage analysis revealed a locus on chromosome 12q13 as a critical region in segregation with triple A syndrome (14). Subsequently, a novel gene (AAAS), encoding a protein of 547 amino acids named ALADIN (for alacrima/achalasia/adrenal insufficiency/neurologic disorder), was identified as a molecular basis of triple A syndrome (13, 15). This protein belongs to the WD repeat family of regulatory proteins, and is located in the nuclear pore complexes (16). Though the function of ALADIN is not yet known, it has been suggested that it could regulate nucleocytoplasmic transport in specific cell types and the development of specific tissues (17). Homozygous and compound heterozygous mutations in the AAAS gene have been identified in several patients with triple A syndrome from different ethnic background (18, 19).

In this study, we aimed to describe the clinical findings and molecular analysis of MC2R, MRAP, and AAAS of five Brazilian patients with ACTH resistance syndrome.

## Subjects and methods

Blood samples were obtained from five patients with ACTH resistance syndrome and their relatives and also from 50 control individuals. This study was performed with informed consent and the approval of the University Hospital Ethics Committee.

### DNA extraction, PCR, and sequencing

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes collected from affected patients and unaffected relatives using QIAamp Blood Kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol. PCR conditions and respective primers were based on previous reports for MC2R (20) and MRAP (6). Amplification of AAAS was performed using specific primers as reported

by Katsumata *et al.* (21). Eight pairs of primers were used to amplify 16 exons of AAAS by PCR with the following annealing temperature: exons 1 and 2, 55 °C; exons 3 and 4, 57 °C; exons 5 and 6, 57 °C; exon 7, 57 °C; exon 8, 57 °C; exons 9 and 10, 55 °C; exons 11–14, 65 °C; and exons 15 and 16, 57 °C. Following PCR amplification of each gene, automated sequencing was performed on ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, according to the manufacturer's protocol (Perkin–Elmer Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA).

The molecular analyses were compared with data-bank information from Ensembl:ENSG00000185231 for MC2R, Ensembl:ENSG00000170262 for MRAP, and Ensembl:ENSG00000094914 for AAAS.

### MC2R expression vectors and stable cell line generation

The full-length coding sequence of MC2R was amplified by PCR from patient and control genomic DNA and cloned into the expression vector pcDNA3.1/V5-His TOPO (Invitrogen). The integrity of the DNA sequence was confirmed by sequencing. Mouse Y6 cells, kindly provided by Prof. Bernard Schimmer, University of Toronto, were grown in DMEM–Ham's F-10 (vol/vol) with horse serum (15%), FBS (5%), and penicillin/streptomycin. Cells were transfected with pcDNA expression vector containing normal orp.Gly116Val MC2R using Lipofectin Reagent (Invitrogen). Cells were selected in the presence of G418 (200  $\mu$ g/ml) 25 days after transfection, and resistant clones were isolated by ringing. Positive clones expressing each mutation were further cultured and tested for cAMP generation.

### ACTH stimulation

Y6 cells expressing the normal or p.Gly116Val MC2R were seeded into 96-well plates and grown until 70–80% confluence. On the day of the experiment, cells were incubated with serum-free medium containing 1 mmol/l 3-isobutyl-1-methylxanthine with different concentrations of ACTH-(1–24) ( $10^{-12}$ – $10^{-6}$  mol/l) or forskolin ( $10^{-5}$  M) for 60 min. After incubation, cells and medium were harvested and cAMP was determined using cAMP Biotrak Enzyme Immunoassay System (Amersham Biosciences).

## Results

### Clinical and molecular findings

**Patient 1** The female patient from consanguineous parents was born at term, with a birth weight of 3600 g and length of 50 cm. In the neonatal period, she had seizures associated with hypoglycemia and, at 1 year of

age, she had respiratory distress and seizures. At the age of 4 years, she was admitted with fever, pneumonia, vomiting, seizures, hypoglycemia (blood glucose: 25 mg/dl), and hypothermia (35.5 °C). On examination, height was above the 97th percentile and generalized excessive skin pigmentation was noticed. No clinical evidence of deficient tear production or achalasia was observed. The parents revealed that her old brother died at 10 months after an episode of convulsion. Biochemical analysis showed cortisol deficiency (0.7 µg/dl) with elevated ACTH (940 pg/ml) plasma levels. There was no cortisol response to ACTH stimulation test. Plasma 17-hydroxyprogesterone levels were 100 ng/dl, within the reference range. Since the diagnosis of FGD, the patient has been maintained on glucocorticoid therapy and appears to have normal growth, free from infections or hypoglycemia, and reduction of skin pigmentation.

The molecular analysis of this patient revealed a novel mutation in the exon 2 of the *MC2R*, with a homozygous substitution of guanine by thymine (g.1042G>T) that results in a substitution of glycine by valine in codon 116 (p.Gly116Val; Fig. 1), which is located at the third transmembrane domain. Her parents and her young healthy brother were heterozygous for p.Gly116Val mutation.

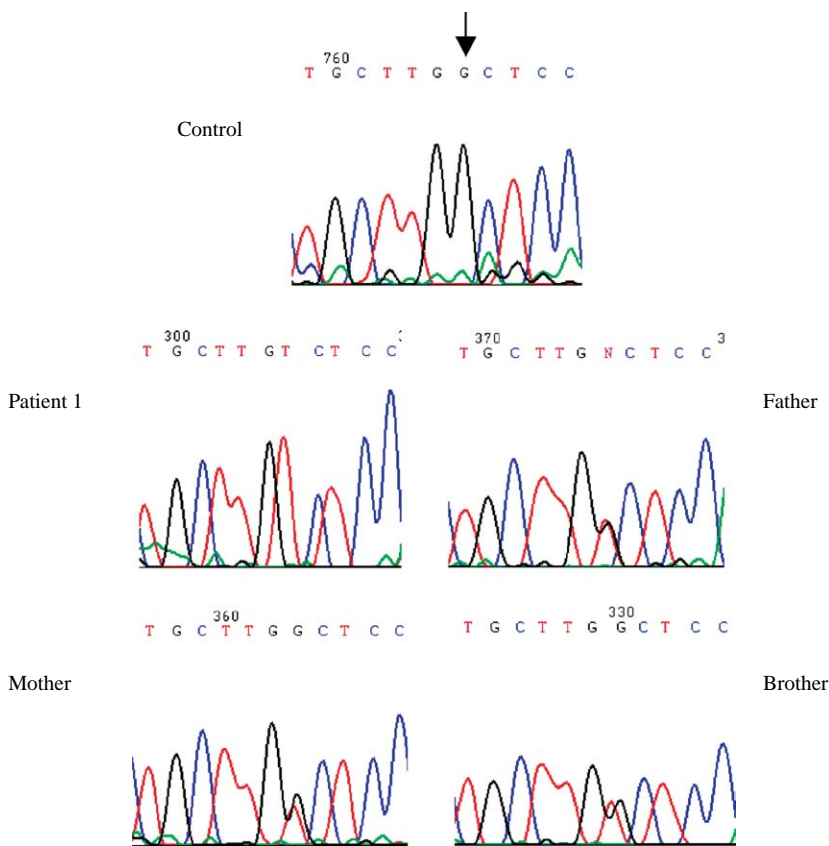
Y6 cells expressing wild-type *MC2R* showed a dose-response pattern of cAMP generation when stimulated

with different doses of ACTH, however, p.Gly116-Val*MC2R* failed to generate cAMP (Fig. 2).

**Patient 2** The female patient from non-consanguineous parents was born at term with a birth weight of 4500 g and length of 55 cm. She showed neonatal jaundice and, at 11 months old, she had convulsions with hypoglycemia and history of recurrent infections. On examination, at 1 year and 10 months, she had height above the 97th percentile, generalized skin pigmentation, and no remarkable neurological findings. Biochemical analysis showed undetectable basal cortisol with elevated plasma ACTH level. There was no cortisol response to ACTH stimulation test. Glucocorticoid treatment improved her symptoms.

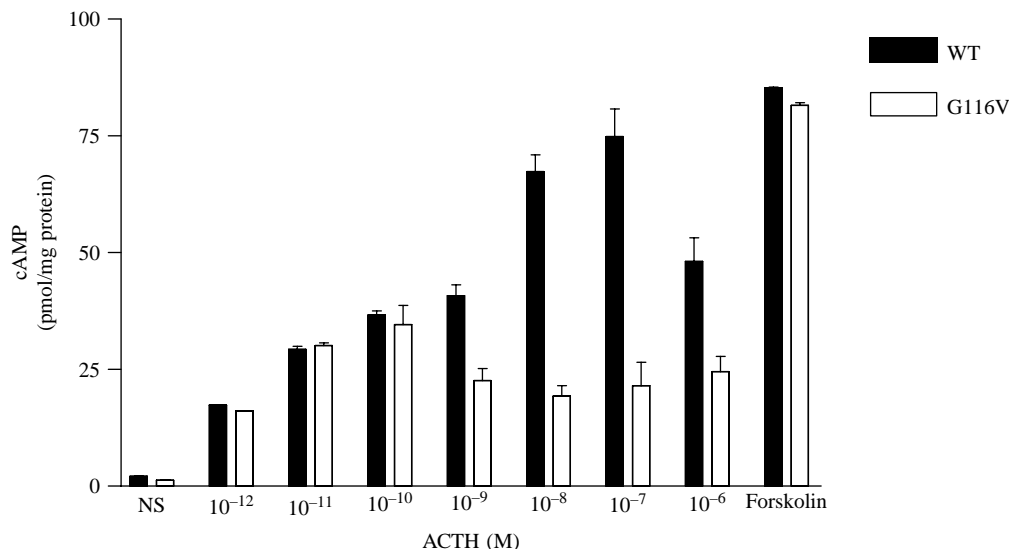
The molecular analysis of *MC2R* gene of this patient showed no alteration. *MRAP* gene analysis showed a homozygous mutation with a substitution of guanine by adenine (g.727G>A; Fig. 3) in the initiation codon (p.Met1Ile). Her parents were heterozygous for the same *MRAP* mutation.

**Patient 3** The female patient was born from consanguineous parents, and at 16 years of age, she showed body weight loss, nausea, vomiting, hyporexia, excessive pigmentation of the tongue and skin, weakness, adynamia, and dizziness. She also presented with lower limb weakness. Her history revealed that she



**Figure 1** Representative direct sequencing of *MC2R* gene showing the homozygous missense mutation (g.1042G>T) in exon 2, that results in a substitution of glycine by valine in codon 116 in patient 1 (p.Gly116Val). Her parents and her brother showed a heterozygous p.Gly116Val *MC2R* mutation.





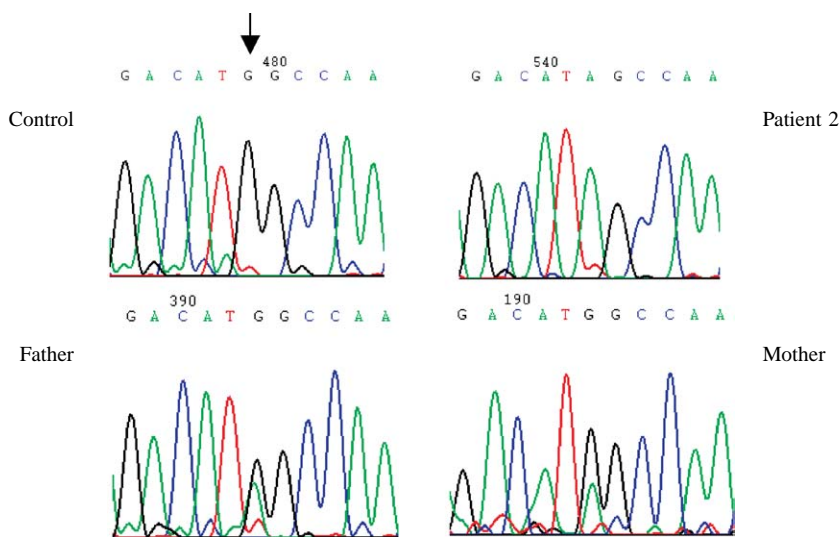
**Figure 2** cAMP responses of Y6 cells transfected with wild-type MC2R or the variant G116V to various concentrations of ACTH-(1–24). Points represent the mean  $\pm$  s.d. for three independent experiments in which each point was determined in duplicate.

had always cried with few tears and the Schirmer test confirmed alacrima. Achalasia was diagnosed by manometry. The laboratory findings revealed elevated ACTH plasma levels (2140 pg/ml), low serum cortisol ( $<1.2$   $\mu$ g/dl), low serum DHEA-S ( $<3.9$   $\mu$ g/dl), and elevated plasma renin activity 19.9 ng/ml per h with serum sodium and potassium of 132 and 5.2 mEq/l, respectively. MRI of the brain and spinal cord revealed bone deformity of the foramen magnum and left atlas arch, causing a slight cervicomedullary compression (Fig. 4). Upon gluco- and mineralocorticoid replacement, she had an improvement of the symptoms. She died of unknown causes at the age of 17 years.

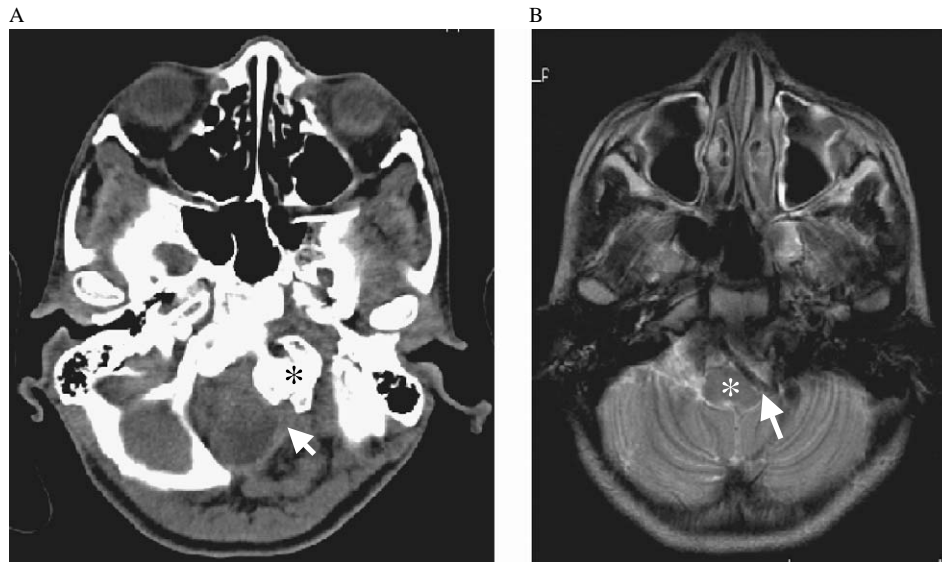
The molecular analysis of this patient showed no alterations in *MC2R* and *MRAP* genes. The analysis of

*AAAS* revealed a novel g.782\_783delTGbase deletion in exon 1 (Fig. 5), which introduces a premature stop codon at position 19. Her mother was heterozygous for the same *AAAS* gene mutation.

**Patient 4** The female patient from consanguineous parents was born at term with a birth weight of 3000 g. At 2 years of age, she had pneumonia and convulsions, which were followed by recurrent infections. At the age of 6 years, she was diagnosed as having rheumatic fever. No clinical evidence of deficient tear production or achalasia was noted. She had four dead brothers (two died of pneumonia before 2 years old and two died of unknown causes) and five healthy siblings. At the age of 7 years, she was admitted with excessive skin pigmentation, dehydration, and nausea. Laboratory



**Figure 3** Representative direct sequencing of *MRAP* gene showing the homozygous missense mutation (g.727G  $>$  A) in patient 2. Her parents were heterozygous for this mutation in the *MRAP* gene.

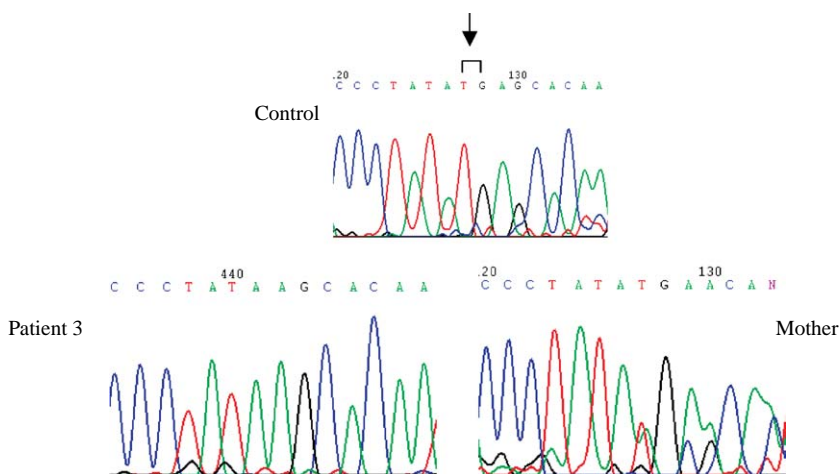


**Figure 4** (A) Axial CT scan of the skull base. Bone deformity of the foramen magnum and left atlas arch (\*), causing a slight compression of cervicomedullary junction (white arrow). (B) Axial T2-weighted MR image, posterior cranial fossa level. Left vertebral artery slightly dilated and tortuous (white arrow), causing small medullary compression (\*).

analysis showed undetectable plasma cortisol levels with no responses after ACTH stimulation. Basal ACTH plasma levels were high (10 670 pg/ml). Sodium, potassium, and glucose plasma levels were 140, 4.1, and 49 mg/dl respectively. A second laboratory re-evaluation, at the age of 13 years, confirmed the undetectable basal and ACTH stimulated plasma cortisol. Plasma 17-hydroxyprogesterone and aldosterone levels, and plasma renin activity were 30 ng/dl, 6.2 ng/dl, and 2.6 ng/ml per h respectively. Computerized tomography showed adrenal atrophy with no other abnormality. She has been on glucocorticoid therapy since 7 years of age with improvement of the symptoms.

The molecular analysis of *MC2R*, *MRAP*, and *AAAS* genes of this patient showed no alterations.

**Patient 5** The female patient, born from non-consanguineous parents, showed seizures associated with hypoglycemia and jaundice, and skin pigmentation in the neonatal period. On examination, at the age of 10 months, her height was above the 97th percentile and she had mild skin pigmentation. Biochemical analysis showed undetectable basal cortisol levels (0.1 µg/dl) with elevated plasma ACTH (2970 pg/ml). Plasma 17-hydroxyprogesterone, aldosterone, plasma renin activity, and sodium and potassium were 4 ng/dl, 4.8 ng/dl, 1.6 ng/ml per h, 137 mEq/l and 5.3 mEq/l respectively. Ultrasonography showed no urogenital morphological abnormality. Glucocorticoid treatment improved her symptoms. The molecular analysis of *MC2R*,



**Figure 5** Representative direct sequencing of *AAAS* gene showing the homozygous deletion g.782\_783delTG in exon 1. Her mother was heterozygous for g.782\_783delTG mutation.

MRAP, and AAAS genes of this patient showed no alterations.

None of the mutations described in the present study was found in control individuals.

## Discussion

In the present study, we report the clinical findings and molecular analysis of four patients with FGD and one patient with triple A syndrome. We found mutations in the MC2R, MRAP, and AAAS genes in three patients and no molecular alterations in these genes in two patients.

With the exception of patient 4, all patients with FGD showed the typical clinical findings of severe cortisol deficiency during the neonatal period. Patient 4 showed pneumonia and convulsions, followed by recurrent infections at 2 years of age. In spite of the early clinical manifestations observed in all FGD patients, the disease was diagnosed only during infancy or childhood, as previously reported (2). The delay of the diagnosis of FGD may be due to the non-specific symptoms and absence of salt loss, and also due to the rarity of the disease. Three out of four patients with FGD had stature above the 97th percentile, a clinical finding already reported in the literature, although its association with ACTH receptor function has not yet been clarified (22).

Patient 3 presented at 16 years of age with the typical clinical findings of triple A syndrome, which were improved by glucocorticoid and mineralocorticoid treatment. Manifestations of ACTH resistance in patients with triple A syndrome may present in a dramatic fashion with hypoglycemia and seizures or may be less severe and not necessitate glucocorticoid replacement until the teenage years or later (23), as observed in this patient. Mineralocorticoid deficiency may be present in about 15% of patients with triple A syndrome, as demonstrated by the elevated plasma renin activity in patient 3. Moreover, this syndrome is frequently associated with a variety of neurological disorders, such as progressive central, peripheral, and autonomic nervous system abnormalities, in 60% of triple A syndrome patients (14, 23). In accordance with these features, patient 3 showed lower limb weakness, which improved by steroid treatment, suggesting that this clinical finding, in this case, might be related to gluco- and mineralocorticoid deficiencies, as previously reported in patients with Addison's disease (24). The causal relationship between medullary compression present in this patient and AAAS mutation remains to be elucidated, since this manifestation has not been described in other triple A patients from the literature.

The molecular analysis of MC2R from patient 1 revealed the p.Gly116Val homozygous mutation. Her parents and her healthy young brother were heterozygous for this mutation. Glycine 116 of MC2R is located in the third transmembrane domain, which is the most buried transmembrane domain in the structural arrangement of the GPCR (25), playing a

critical role in receptor activation (26). In fact, mutagenesis and biochemical studies have demonstrated that activation of several GPCRs by ligand binding causes changes in the orientation of transmembrane domains 3 and 6 (27).

Glycine is a member of a group of small and weakly polar amino acids that are conserved among the class A GPCR family, other members being alanine, serine, cysteine, and threonine (28). In the case of MC2R, there is an interspecies conservation of glycine 116, as shown in Fig. 6. Moreover, in the melanocortin receptor family at the equivalent position to glycine 116, there is a serine residue in human MC1R and an alanine residue in human MC3R, MC4R, and MC5R (29). In addition, more than 80% of group conservation of these small and weakly polar amino acids among other class A GPCR members has been described (28). These amino acids play an important role in mediating helix–helix contact in the GPCRs, which is essential for receptor stabilization in an inactive conformation in the absence of ligand (30). It is interesting to note that changing of serine 120, also a weakly polar amino acid located at the third transmembrane domain of MC2R, to a positively charged arginine (p.Ser120Arg) was shown to be associated with FGD (31). Functional study of p.Ser120Arg mutated MC2R demonstrated loss of function of the receptor, with no cAMP production after ACTH stimulation (32). Therefore, the substitution of glycine at codon 116 by valine, a hydrophobic amino acid, in the ACTH receptor, as found in patient 1, is likely to impair its function, leading to ACTH resistance.

To investigate the functional effect of p.Gly116Val mutation, we carried out *in vitro* ACTH stimulation using Y6 cells transfected with wild-type and mutant receptors. Wild-type MC2R showed cAMP generation in a dose–response pattern, though a decrease of cAMP generation was observed at the highest dose of ACTH. This pattern of response has been described for other GPCRs (33, 34), indicating loss or decrease of agonist efficacy in receptor activation. It is possible that desensitization of the MC2R may account for this, although it is notable that the wild-type receptor does not show this response except possibly at high ACTH concentrations, and in mouse Y1 cells, this receptor has been shown to desensitize relatively slowly in response to ACTH (35). Functional study of p.Gly116Val mutated MC2R showed a decreased cAMP generation when stimulated with ACTH. Therefore, this result confirms that the p.Gly116Val mutation affects signal transduction leading to ACTH resistance.

The MC2R molecular analysis of patient 2 did not show alteration of this gene. However, the molecular analysis of MRAP demonstrated a homozygous mutation with a substitution of guanine by adenine (g.727G>A) in the initiation codon (p.Met1Ile). This missense mutation was previously described by Metherell *et al.* (6) in nine patients from eight families. In their study, they showed that MRAP and MC2R interact and

## A – MC2R

<i>Homo sapiens</i>	I I D S L F V L S L L <u>G</u> S I F S L S V I A A D R Y
<i>Mus musculus</i>	I I D C M F I L S L L <u>G</u> S I F S L S V I A A D R Y
<i>Bos taurus</i>	V V D S L F I L S L L <u>G</u> S I C S L S V I A A D R Y
<i>Canis familiaris</i>	I M D S L F I L S L L <u>G</u> S I F S L S V I A A D R Y
<i>Ratus norvegicus</i>	I I D C M F V L S L L <u>G</u> S I F S L S V I A A D R Y
<i>Macaca mulatta</i>	I I D S L F V L S L L <u>G</u> S I F S L S V I A A D R Y

## B – Human melanocortin receptor

Human MC2R	I I D S L F V L S L L <u>G</u> S I F S L S V I A A D R Y
Human MC1R	V I D V I T C S S M L <u>S</u> S L C F L G A I A V D R Y
Human MC3R	I F D S M I C I S L V <u>A</u> S I C N L L A I A V D R Y
Human MC4R	V I D S V I C S S L L <u>A</u> S I C S L L S I A V D R Y
Human MC5R	V F D S M I C I S V V <u>A</u> S M C S L L A I A V D R Y

**Figure 6** Alignment of the amino acid sequences of the (A) MC2R from different species and (B) human melanocortin receptors. Conserved weak polar amino acids (glycine, alanine, and serine) in a region of the receptors within the third transmembrane domain are highlighted in bold and underlined letters.

are co-localized in the endoplasmic reticulum and plasma membrane.

Though not frequent, mutations in the initiation codon have been reported as a cause of human diseases (36–38). It has been demonstrated that initiation at non-AUG codons is inefficient in eukaryotic cells (39). It has been shown *in vitro* that mutation at the initiation AUG prevent the RNA polymerase from recognizing the translation start codon (36). Mutations in the initiation codon may lead to a translation of mutant mRNA from a subsequent in-frame initiation codon, resulting in a truncated protein with a predictable severe loss of function. In patients with  $\beta$ -thalassemia, more severe anemia has been associated with different mutations in the initiation codon of the  $\beta$ -globin gene (37). More recently, Yu *et al.* (40) showed that M1I mutation, due to a change of ATG to ATC, in the initiation codon of *LPL* gene results in a reduced catalytic activity of lipoprotein lipase. Taking into account these reports, we can assume that mutation at the initiation codon of MRAP would result in a loss of the N-terminus of the protein, which would probably be non-functional, leading to the ACTH resistance in patient 2.

The diagnosis of triple A syndrome in patient 3 was confirmed by molecular analysis of *AAAS*, which revealed a novel g.782\_783delTGbase deletion in exon 1. Her mother was heterozygous for the same *AAAS* gene mutation. Homozygous and compound heterozygous *AAAS* gene mutations have been described in 95% of the patients with triple A syndrome from different ethnic backgrounds (1, 18). The majority of mutations in *AAAS* gene are nonsense, frameshift, or

splice site with some missense mutations (23, 41). Though the function of ALADIN is not yet well established, this protein localizes in the nuclear pore and is involved in the nucleocytoplasmic transport (17, 18, 42). Studying natural variants described in triple A syndrome, a mislocalization of mutant ALADIN proteins in the cytoplasm was demonstrated (17, 42).

Storr *et al.* (43) showed high expression of *AAAS* mRNA in the adrenal cortex and CN (CNS), mostly in the cerebral cortex, cerebellum, hippocampus, motor-associated nuclei of the brainstem including cranial nerve nuclei, and ventral horn of the spinal cord. This pattern of expression confirms the role of ALADIN in the adrenal and CNS function and agrees with the clinical features of triple A syndrome. However, the wide variety and severity of clinical findings in triple A syndrome (1), the absence of phenotype resembling human disease in *Aaas*<sup>-/-</sup> in mice, indicate that additional factors may be involved in the pathogenesis of this disease (42).

Molecular analysis of DNA from patients 4 and 5 did not show mutation in *MC2R*, *MRAP*, and *AAAS* genes. This result is in accordance with previous report that about 50% of FGD has unknown genetic cause (1). Recently, it was shown that MC2R interacts with Nup50, a nuclear pore complex protein (44), suggesting that this interaction could be a novel mechanism of action of ACTH receptor (45). The participation of changes in Nup50 function as a cause of ACTH resistance syndrome remains to be established.

In conclusion, we describe five patients with ACTH resistance syndrome with heterogeneous clinical findings, suggesting that excluding congenital adrenal

hyperplasia, this rare syndrome should be investigated in infants and children with congenital adrenal insufficiency. Furthermore, besides genes already known to be involved in the FGD pathogenesis, other accessory proteins to ACTH receptor function may also underline the molecular basis of this disease.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Sandra Rodrigues, Valci Silva, and Marina Holanda for their technical assistance. This research was supported by FAPESP, CNPq, and FAPEA.

## References

- Metherell LA, Chan LF & Clark AJ. The genetics of ACTH resistance syndromes. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology* 2006 **20** 547–560.
- Clark AJ & Weber A. Adrenocorticotropin insensitivity syndromes. *Endocrine Reviews* 1998 **19** 828–843.
- Shepard TH, Landing BH & Mason DG. Familial Addison's disease; case reports of two sisters with corticoid deficiency unassociated with hypoadosteronism. *American Journal of Diseases of Children* 1959 **97** 154–162.
- Vamvakopoulos NC, Rojas K, Overhauser J, Durkin AS, Nierman WC & Chrousos GP. Mapping the human melanocortin 2 receptor (adrenocorticotropin hormone receptor; ACTHR) gene (MC2R) to the small arm of chromosome 18 (18p11.21-pter). *Genomics* 1993 **18** 454–455.
- Clark AJ, McLoughlin L & Grossman A. Familial glucocorticoid deficiency associated with point mutation in the adrenocorticotropin receptor. *Lancet* 1993 **341** 461–462.
- Metherell LA, Chapple JP, Cooray S, David A, Becker C, Ruschendorf F, Naville D, Begeot M, Khoo B, Nurnberg P, Huebner A, Cheetham ME & Clark AJ. Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nature Genetics* 2005 **37** 166–170.
- Modan-Moses D, Ben-Zeev B, Hoffmann C, Falik-Zaccai TC, Bental YA, Pinhas-Hamiel O & Anikster Y. Unusual presentation of familial glucocorticoid deficiency with a novel MRAP mutation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006 **91** 3713–3717.
- Roy S, Rached M & Gallo-Payet N. Differential regulation of the human adrenocorticotropin receptor [melanocortin-2 receptor (MC2R)] by human MC2R accessory protein isoforms alpha and beta in isogenic human embryonic kidney 293 cells. *Molecular Endocrinology* 2007 **21** 1656–1669.
- Génin E, Huebner A, Jaillard C, Faure A, Halaby G, Saka N, Clark AJ, Durand P, Bégeot M & Naville D. Linkage of one gene for familial glucocorticoid deficiency type 2 (FGD2) to chromosome 8q and further evidence of heterogeneity. *Human Genetics* 2002 **111** 428–434.
- Allgrove J, Clayden GS, Grant DB & Macaulay JC. Familial glucocorticoid deficiency with achalasia of the cardia and deficient tear production. *Lancet* 1978 **1** 1284–1286.
- Huebner A, Elias LL & Clark AJ. ACTH resistance syndromes. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 1999 **1** 277–293.
- Gazarian M, Cowell CT, Bonney M & Grigor WG. The '4A' syndrome: adrenocortical insufficiency associated with achalasia, alacrima, autonomic and other neurological abnormalities. *European Journal of Pediatrics* 1995 **154** 18–23.
- Handschug K, Sperling S, Yoon SJ, Hennig S, Clark AJ & Huebner A. Triple A syndrome is caused by mutations in AAAS, a new WD-repeat protein gene. *Human Molecular Genetics* 2001 **10** 283–290.
- Huebner A, Yoon SJ, Ozkinay F, Hilscher C, Lee H, Clark AJ & Handschug K. Triple A syndrome—clinical aspects and molecular genetics. *Endocrine Research* 2000 **26** 751–759.
- Tullio-Pelet A, Salomon R, Hadj-Rabia S, Mugnier C, de Laet MH, Chaouachi B, Bakiri F, Brottier P, Cattolico L, Penet C, Begeot M, Naville D, Nicolino M, Chaussain JL, Weissenbach J, Munnich A & Lyonnet S. Mutant WD-repeat protein in triple-A syndrome. *Nature Genetics* 2000 **26** 332–335.
- Cronshaw JM & Matunis MJ. The nuclear pore complex: disease associations and functional correlations. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2004 **15** 34–39.
- Cronshaw JM & Matunis MJ. The nuclear pore complex protein ALADIN is mislocalized in triple A syndrome. *PNAS* 2003 **100** 5823–5827.
- Krumbholz M, Koehler K & Huebner A. Cellular localization of 17 natural mutant variants of ALADIN protein in triple A syndrome—shedding light on an unexpected splice mutation. *Biochemistry and Cell Biology* 2006 **84** 243–249.
- Sandrini F, Farmakidis C, Kirschner LS, Wu SM, Tullio-Pelet A, Lyonnet S, Metzger DL, Bourdony CJ, Tiosano D, Chan WY & Stratakis CA. Spectrum of mutations of the AAAS gene in Allgrove syndrome: lack of mutations six kindreds with isolated resistance to corticotrophin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001 **86** 5433–5437.
- Elias LL, Huebner A, Pullinger GD, Mirtella A & Clark AJ. Functional characterization of naturally occurring mutations of the human adrenocorticotropin receptor: poor correlation of phenotype and genotype. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999 **84** 2766–2770.
- Katsumata N, Hirose H, Kagami M & Tanaka T. Analysis of the AAAS gene in a Japanese patient with triple A syndrome. *Endocrine Journal* 2002 **49** 49–53.
- Elias LL, Huebner A, Metherell LA, Canas A, Warne GL, Bitti ML, Cianfarani S, Clayton PE, Savage MO & Clark AJ. Tall stature in familial glucocorticoid deficiency. *Clinical Endocrinology* 2000 **53** 423–430.
- Houlden H, Smith S, De Carvalho M, Blake J, Mathias C, Wood NW & Reilly MM. Clinical and genetic characterization of families with triple A (Allgrove) syndrome. *Brain* 2002 **125** 2681–2690.
- Mor F, Green P & Wysenbeek AJ. Myopathy in Addison's disease. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1987 **46** 81–83.
- Baldwin JM. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO Journal* 1993 **12** 1693–1703.
- Chelikani P, Hornak V, Eilers M, Reeves PJ, Smith SO, Rajbhandary UL & Khorana HG. Role of group-conserved residues in the helical core of  $\beta$ 2-adrenergic receptor. *PNAS* 2007 **104** 7027–7032.
- Hamm HE. How activated receptors couple to G proteins. *PNAS* 2001 **98** 4819–4821.
- Eilers M, Hornak V, Smith SO & Konopka JB. Comparison of class A and D G protein-coupled receptors: common features in structure and activation. *Biochemistry* 2005 **44** 8959–8975.
- Clark AJ & Cammas FM. The ACTH receptor. *Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996 **10** 29–47.
- Liu W, Eilers M, Patel AB & Smith SO. Helix packing moments reveal diversity and conservation in membrane protein structure. *Journal of Molecular Biology* 2004 **337** 713–729.
- Tsigos C, Arai K, Hung W & Chrousos GP. Hereditary isolated glucocorticoid deficiency is associated with abnormalities of the adrenocorticotropin receptor gene. *Journal of Clinical Investigation* 1993 **92** 2458–2461.
- Penhoat A, Naville D, El Mourabit H, Buronfosse A, Berberoglu M, Ocal G, Tsigos C, Durand P & Begeot M. Functional relationships between three novel homozygous mutations in the ACTH receptor gene and familial glucocorticoid deficiency. *Journal of Molecular Medicine* 2002 **80** 406–411.

- 33 Birnbaumer M, Antaramian A, Themmen AP & Gilbert S. Desensitization of the human V2 vasopressin receptor. Homologous effects in the absence of heterologous desensitization. *Journal of Biological Chemistry* 1992 **267** 11783–11788.
- 34 Yasuda G, Umemura S & Jeffries WB. Effect of epinephrine on cAMP accumulation in cultured rat inner medullary collecting duct cells. *American Journal of Physiology* 1997 **272** 192–197.
- 35 Baig AH, Swords FM, Noon LA, King PJ, Hunyady L & Clark AJ. Desensitization of the Y1 cell adrenocorticotropin receptor: evidence for a restricted heterologous mechanism implying a role for receptor-effector complexes. *Journal of Biological Chemistry* 2001 **276** 44792–44797.
- 36 Chen CH, Astrin KH, Lee G, Anderson KE & Desnick RJ. Acute intermittent porphyria: identification and expression of exonic mutations in the hydroxymethylbilane synthase gene. An initiation codon missense mutation in the housekeeping transcript causes "variant acute intermittent porphyria" with normal expression of the erythroid-specific enzyme. *Journal of Clinical Investigation* 1994 **94** 1927–1937.
- 37 Waye JS, Eng B, Patterson M, Barr RD & Chui DH. *De novo* mutation of the beta-globin gene initiation codon (ATG->AAG) in a Northern European boy. *American Journal of Hematology* 1997 **56** 179–182.
- 38 Hayashi Y, Kamijo T, Yamamoto M, Phillips JA III, Ogawa M & Seo H. A case with isolated growth hormone deficiency caused by compound heterozygous mutation in GH-1: a novel mutation in the initiation codon and 7.6 kb deletion. *Growth Hormone and IGF Research* 2007 **17** 249–253.
- 39 Kozak M. Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eukaryotic cell-free translation systems. *Molecular and Cellular Biology* 1989 **9** 5073–5080.
- 40 Yu XH, Zhao TQ, Wang L, Liu ZP, Zhang CM, Chen R, Li L, Liu G & Hu WC. A novel substitution at the translation initiator codon (ATG->ATC) of the lipoprotein lipase gene is mainly responsible for lipoprotein lipase deficiency in a patient with severe hypertriglyceridemia and recurrent pancreatitis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006 **341** 82–87.
- 41 Brooks BP, Kleta R, Stuart C, Tuchman M, Jeong A, Stergiopoulos SG, Bei T, Bjornson B, Russell L, Chanoine J-P, Tsagarakis S, Kalsner LR & Stratakis CA. Genotypic heterogeneity and clinical phenotype in triple A syndrome: a review of the NIH experience 2000–2005. *Clinical Genetics* 2005 **68** 215–221.
- 42 Huebner A, Mann P, Rohde E, Kaindl AM, Witt M, Verkade P, Jakubiczka S, Menschikowski M, Stoltenburg-Didiger G & Koehler K. Mice lacking the nuclear pore complex protein LADIN show female infertility but fail to develop a phenotype resembling human triple A syndrome. *Molecular and Cellular Biology* 2006 **26** 1879–1887.
- 43 Storr HL, Clark AJ, Priestley JV & Michael GJ. Identification of the sites of expression of triple A syndrome mRNA in the rat using *in situ* hybridisation. *Neuroscience* 2005 **131** 113–123.
- 44 Fan F, Liu CP, Korobova O, Heyting C, Offenberger HH, Trump G & Arnheim N. cDNA cloning and characterization of Npap60: a novel rat nuclear pore-associated protein with an unusual subcellular localization during male germ cell differentiation. *Genomics* 1997 **40** 444–453.
- 45 Doufexis M, Storr HL, King PJ & Clark AJL. Interaction of the melanocortin 2 receptor with nucleoporin 50: evidence for a novel pathway between a G-protein-coupled receptor and the nucleus. *FASEB Journal* 2007 **21** 4095–4100.

---

Received 31 March 2008

Accepted 4 April 2008

**Author Queries**

*JOB NUMBER:* 080079

*JOURNAL:* EJE

- Q1 Please check all the affiliation details.
- Q2 Please provide postal code for all the affiliations.
- Q3 Please provide expansions of the acronyms 'MC2R, MRAP, DMEM, FBS and CNS'.
- Q4 Please provide the length of the female patient in the sentence 'The female patient from consanguineous...', if any.

**Data:** Mon, 7 Apr 2008 09:20:15 -0400 (EDT)

**De:** <http://www.google.com/search?q=eje@endocrinology.org>

**Para:** llelias@fmrp.usp.br

**Assunto:** European Journal of Endocrinology - Decision on Manuscript  
EJE-08-0079.R2

07-Apr-2008

Dear Prof. Elias:

I have pleasure in informing you that your manuscript, EJE-08-0079.R2 entitled "HETEROGENEITY IN THE MOLECULAR BASIS OF ACTH RESISTANCE SYNDROME", has been accepted for publication in the European Journal of Endocrinology.

The Accepted Preprint of your article will appear online at <http://www.eje-online.org/> shortly unless you have checked the box on your copyright agreement form specifically requesting that your article does not appear as an Accepted Preprint. Your manuscript will be available at <http://dx.doi.org/10.1530/>, and this link will continue to work even when your article is published in its final form.

If you have not already returned one, a copyright agreement form is available at <http://www.eje-online.org/misc/copyrightform.html.dtl>. This must be completed and returned signed by all the authors as a condition of publication.

If your manuscript contains colour figures and you have not yet completed the colour charges form, please do so now at <http://www.eje-online.org/misc/Colourackeje.pdf>. I would be grateful if you could return both these forms as soon as you can to the fax number provided.

As usual, the page proofs will be despatched to you by e-mail in due course for corrections.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the European Journal of Endocrinology, we look forward to your continued contributions to the journal.

Sincerely,

Prof. Christian Strasburger

Editor-in-Chief, European Journal of Endocrinology

Prof. Jerome Bertherat

Editor, European Journal of Endocrinology

BioScientifica Ltd, Reg. in England no. 3190519; Euro House, 22 Apex Court,  
Woodlands, Bradley Stoke, Bristol BS32 4JT, United Kingdom



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)