

Atividade Enzimática da 21-Hidroxilase e da 3 β -Hidroxiesteróide Desidrogenase em Mulheres Hirsutas com e sem Anovulação Crônica

3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase and 21-Hydroxylase Enzymatic Activities in Hirsute Women with and without Chronic Anovulation

Marco Fábio Prata Lima¹, Edmund Chada Baracat², Geraldo Rodrigues de Lima², Dolores Perovano Pardini², Cléber Sérgio da Silva¹, Marcos Roberto Caetano¹

RESUMO

Objetivos: *testar a atividade supra-renal por meio de um estímulo potente sobre sua camada reticular com o intuito de aferir a atividade da 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD) e da 21-hidroxilase (21OH).*

Métodos: *concentrações plasmáticas de 17 α OH-pregnenolona, 17 α OH-progesterona, cortisol, progesterona, androstenediona, deidroepiandrosterona (DHEA), sulfato de deidroepiandrosterona (SDHEA) e testosterona livre foram determinadas em 39 mulheres, sendo 13 normais (2 utilizadas como piloto) e 26 com hirsutismo idiopático nos tempos 0, 12 e 24 horas após injeção de ACTH-depot.*

Resultados: *entre as mulheres hirsutas, identificamos respostas que permitem indicar qualquer bloqueio nas diversas etapas da esteroidogênese, conduzindo ao diagnóstico de função supra-renal diminuída em graus leve/moderado. As concentrações de 17 α OH-pregnenolona partiram de 2,0 para 24,6 ng/ml, as de cortisol aumentaram de 2,1 para 45,3 e 38,4 μ g/dL, as de 17 α OH-progesterona sofreram incremento de 50,7 para 346 e 218 ng/dL e os níveis de progesterona se elevaram de 0,3 para 4,4 e 2,2 ng/mL. Entre os hormônios da camada reticular verificamos aumento do SDHEA de 274,7 para 495,5 e 505,8 ng/dL, os de androstenediona de 1,1 para 4,0 e 4,5 ng/mL, os de testosterona livre de 1,3 para 1,8 e 2,7 pg/mL e os de DHEA de 2,4 para 4,7 e 8,5 ng/mL. Na avaliação individualizada uma paciente revelou defeito de 3 β -HSD e duas outras, provável defeito de 21OH.*

Conclusões: *estes achados sugerem que o teste com ACTH-depot pode ser utilizado para excluir a supra-renal como possível fonte hiperandrogênica em mulheres com hirsutismo, com ou sem anovulação crônica.*

PALAVRAS-CHAVE: *21-hidroxilase. Hirsutismo. Hiperplasia supra-renal. Testes funcionais.*

Introdução

Os defeitos de início tardio da 21-hidroxilase (21OH), da 11-hidroxilase (11OH) e da 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD),

¹Setor de Ginecologia Endócrina e Climatério da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro – Uberaba-MG – Brasil

²Setor de Ginecologia Endócrina da Disciplina de Ginecologia da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo – SP.

Correspondência: Marco Fábio Prata Lima

Rua: São Sebastião, 67

38010-430 – Uberaba – MG

Fone: (0xx34) 318 5326 - Fax: (0xx34) 318 5342

e-mail:m_fábio@mednet.com.br

de causa supra-renal e ovariana, têm sido associados a hiperandrogenismo, com ou sem alterações menstruais, desde 1965, quando Axerold et al.¹ descreveram uma paciente com anovulação crônica que poderia apresentar concomitantemente vários defeitos de síntese, dentre os quais o da 3 β -HSD. Investigadores têm relatado uma ligação entre este defeito e hirsutismo idiopático em até 16% dos casos². A deficiência da 3 β -HSD afeta a síntese de todos os esteróides supra-renais e ovarianos. Há um excessivo acúmulo de pregnenolona, 17OH-pregnenolona (17OH-P), deidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediol no sangue. O DNA codificador da

3 β -HSD humana foi recentemente determinado e seu gene mapeado no cromossomo 1³, sendo esta enzima detectada por técnicas de hibridização no ovário e na supra-renal do rato⁴. No entanto, critérios consistentes para seu diagnóstico ainda estão por ser estabelecidos⁵. No homem dois tipos de genes codificam o componente protéico da 3 β -HSD. O tipo I é encontrado na placenta, mamas e pele, ao passo que o gene do tipo II é achado na supra-renal e ovários. É lógico supor que a atividade supra-renal seja alterada em um ou mais alelos do gene do tipo II, como é visto na forma clássica da doença. O ponto da principal alteração seria a região codificante ou os éxons-introns do gene do tipo II. Recentemente, mutações específicas foram identificadas no gene do tipo II da 3 β -HSD em mulheres com pubarca precoce e adultas com hirsutismo⁶.

O defeito da 21OH foi, até hoje, o mais bem estudado. Esta deficiência é transmitida de forma autossômica recessiva, sendo que homens e mulheres são igualmente afetados⁷. Dupont et al.⁸ relacionaram o complexo HLA a esta deficiência, o qual se localiza no braço curto do cromossomo seis e codifica uma série de antígenos leucocitários de superfície. Assim, para forma clássica há maior frequência do HLA-BW 47; DR7 e para a forma tardia, HLA-B14; DR1. Este defeito constitui a desordem autossômica mais comum na espécie humana⁷. O defeito da 11OH é raro e sua patogênese foi até agora pouco estudada. Clinicamente diferencia-se do defeito da 21OH pela presença de hipertensão arterial leve/moderada, nas pacientes com início tardio⁹.

Estes dados indicam que a patogênese da diminuição da atividade das formas leve/moderada desta enzima, também conhecida como de início tardio ou não-clássica, ainda é bastante desconhecida. O diagnóstico destas enzimopatias tem sido feito com base no teste de estímulo com ACTH. O procedimento mais comum é a administração de 0,25 mg de ACTH endovenoso, seguida da avaliação dos níveis séricos de alguns hormônios, 30 e 60 minutos após. Porém, o estímulo causado pelo ACTH sobre a supra-renal não é idêntico sobre suas três camadas. Por este motivo, supõe-se que cada camada teria um funcionamento distinto, respondendo como unidades endócrinas isoladas¹⁰.

A zona reticular e a zona fasciculada respondem de forma diferente às mesmas concentrações de ACTH. Por outro lado, sabe-se que a produção de sulfato de deidroepiandrosterona (SDHEA) e a testosterona não respondem ao estímulo com ACTH e alguns trabalhos não mostram aumento das concentrações de androstenediona, motivo pelo qual a relação DHEA/an-

drostenediona não é aceita por todos os autores como método diagnóstico de defeito tardio de 3 β -HSD¹¹. Entretanto, outros afirmam que esta relação e a relação 17 α OH-pregnenolona/17 α OH-progesterona se equivalem^{12,13}. Para o defeito de início tardio da 21OH utiliza-se a dosagem basal e pós-estímulo com ACTH da 17OH-progesterona e a determinação do antígeno HLA¹⁴.

A interpretação do teste com ACTH não é unânime na literatura. Temos utilizado o nomograma de New, uma vez que este pode prever o genótipo da deficiência¹⁵. Na avaliação do defeito da 11OH, a dosagem do composto S(11-deoxicortisol) basal e pós-estímulo com ACTH sugere o diagnóstico⁹.

Tendo em vista as dificuldades acima apontadas e observando a desproporção entre a frequência dos defeitos enzimáticos e os seus diagnósticos, tentou-se neste estudo avaliar a resposta das supra-renais a um estímulo mais potente, objetivando com isto diagnosticar estas deficiências mais objetivamente em mulheres hirsutas, anovulatórias ou não.

Pacientes e Métodos

Foram selecionadas junto ao Ambulatório de Ginecologia Endócrina da Disciplina de Ginecologia da Escola Paulista de Medicina 26 mulheres com hirsutismo, 17 destas com hirsutismo idiopático e/ou acne e 9 com associação de síndrome do ovário policístico com irregularidades menstruais (Grupo I), e 13 mulheres normais (Grupo II), sendo que duas delas foram utilizadas como grupo piloto. Irregularidades menstruais foram definidas por oligomenorréia ou amenorréia.

Nenhuma das pacientes estudadas tinha antepassados oriundos do Mediterrâneo e foram selecionadas ao acaso. As pacientes tinham idade entre 14 e 37 anos e as do grupo controle entre 24 e 36 anos. Todas as mulheres apresentaram um índice de massa corpórea menor que 25¹⁶, assim como ovários normais ou policísticos ao exame clínico e ultra-sonográfico.

As pacientes não ingeriram qualquer medicamento por pelo menos três meses antes da realização dos testes. Todas se apresentavam em fase folicular precoce do ciclo menstrual (1º ao 5º dia). O hirsutismo foi classificado pelo índice de Ferriman e Gallwey¹⁷. Aquelas pacientes com irregularidades menstruais que sugeriram anovulação crônica tiveram dosados os valores de progesterona no 22º dia do ciclo menstrual. Valores inferiores a 3 ng/ml foram valorizados.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Paulista de Medicina.

Teste de estímulo com ACTH-depot (Grupo piloto)

Duas mulheres normais foram internadas e submetidas a protocolo que constava na ingestão da 1.0 mg de dexametasona às 22 horas da noite anterior à realização do teste. Às 8 horas da manhã do dia seguinte, era administrado ACTH-depot por via intramuscular após prévia coleta de sangue basal. As pacientes foram então monitorizadas pela punção de veia antecubital mantida pérvia entre as coletas por solução de heparina 1:10. Foi efetuada coleta de sangue a cada 4 horas por período de 48 horas, excetuando-se os tempos 32, 40 e 44 horas.

Teste de estímulo com ACTH-depot (Grupos I e II)

Após a obtenção dos resultados iniciais foram escolhidos os tempos 12 e 24 horas, como os de maior pico de ação hormonal e que foram confirmados nas pacientes do grupo controle, que se mantiveram, entretanto, em regime ambulatorial. Procedimento idêntico foi adotado nas pacientes do grupo de mulheres hirsutas.

Em todas as amostras escolhidas foram analisados os seguintes hormônios: $17\alpha\text{OH}$ -pregnenolona, $17\alpha\text{OH}$ -progesterona, cortisol, progesterona, DHEA, SDHEA, androstenediona e testosterona livre. Foram também analisadas as relações $17\alpha\text{OH}$ -pregnenolona/ $17\alpha\text{OH}$ -progesterona, $17\alpha\text{OH}$ -pregnenolona/cortisol e DHEA/androstenediona. Estes ensaios foram realizados por radioimunoensaio por quimioluminescência, de acordo com métodos previamente publicados¹⁸⁻²¹.

Análise estatística

A comparação dos resultados dos testes laboratoriais entre o grupo controle e o de pacientes foi feita pelo teste de Mann-Whitney. Os valores basais e pós-estímulo foram comparados pelos testes não-paramétricos de Wilcoxon, Friedman e Hollander²².

Resultados

Grupo piloto

Em linhas gerais os hormônios da camada fasciculada responderam de forma mais intensa e precoce que os hormônios da camada reticulada. Houve pico por volta de 4 horas, manutenção de platô variável, seguido de queda a partir de 12 horas. Já os hormônios da camada reticulada obtiveram um aumento menos pronunciado e mais tardio, sendo em 24 horas ob-

servado seu incremento máximo (Figuras 1 e 2).

Grupos de estudo

Os resultados obtidos nos Grupos I e II estão sumarizados na Tabela 1 e Figura 3 e 4. Na Tabela I observa-se incremento de todos os hormônios estudados. Os valores dos hormônios produzidos pela camada fasciculada ($17\alpha\text{OH}$ -pregnenolona, $17\alpha\text{OH}$ -progesterona, cortisol e progesterona) foram significativamente maiores 12 horas após a injeção de ACTH-depot, com incrementos percentuais variando entre 426% e 1935%. Já os hormônios produzidos pela camada reticular (DHEA, SDHEA, androstenediona e testosterona livre) obtiveram picos de secreção mais tardiamente, ao redor de 24 horas após a realização do estímulo.

Nas Figuras 3 e 4 observam-se os valores individuais dos hormônios de todas as pacientes estudadas. Em nenhum momento observaram-se diferenças significantes no comportamento de ambos os grupos.

A avaliação individualizada dos resultados mostrou que pelo menos uma paciente do grupo preencheu todos os parâmetros para o diagnóstico de defeito da 3β -HSD (adaptados de Pang et al.²³). Por outro lado, a avaliação dos valores individuais de $17\alpha\text{OH}$ -progesterona e de progesterona revelou que duas pacientes (ambas do Grupo II) poderiam se enquadrar na forma críptica (assintomática) do defeito da 21OH .

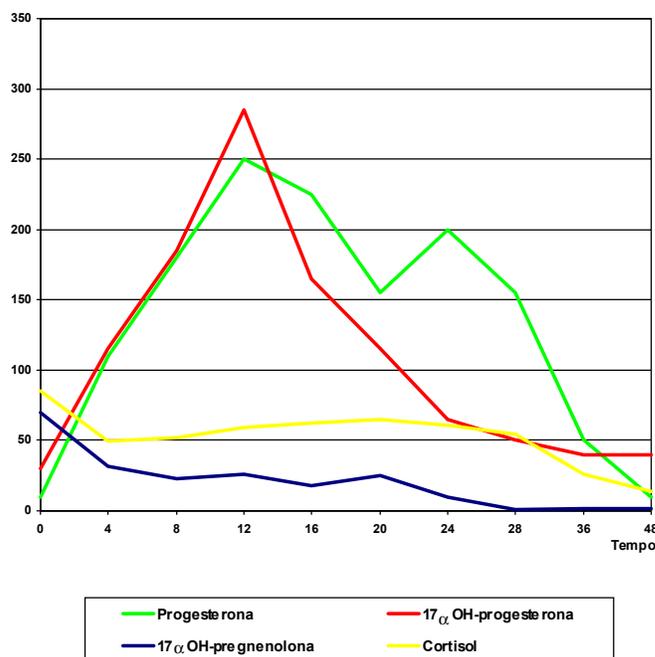


Figura 1 - Valores absolutos dos níveis de progesterona, $17\alpha\text{OH}$ -progesterona, $17\alpha\text{OH}$ -pregnenolona e cortisol em pacientes do grupo piloto após estímulo com ACTH-depot.

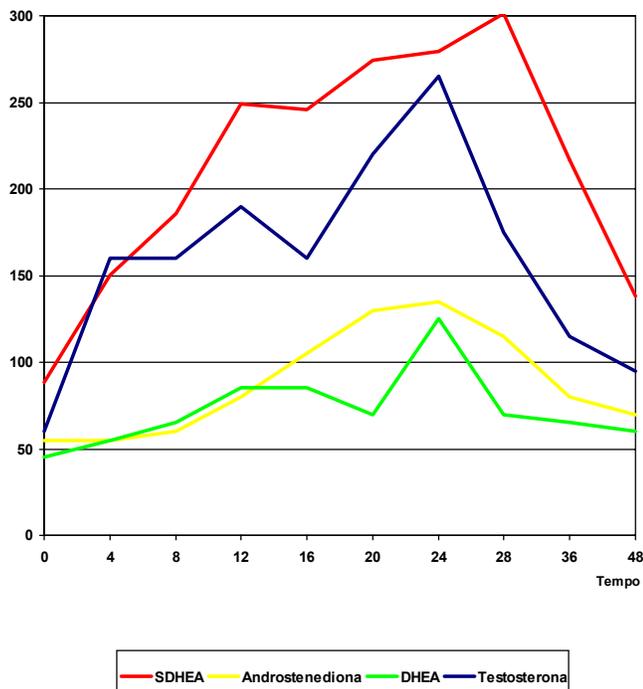


Figura 2 - Valores absolutos dos níveis de SDHEA, androstenediona, DHEA e testosterona em pacientes do grupo piloto após estímulo com ACTH-depot.

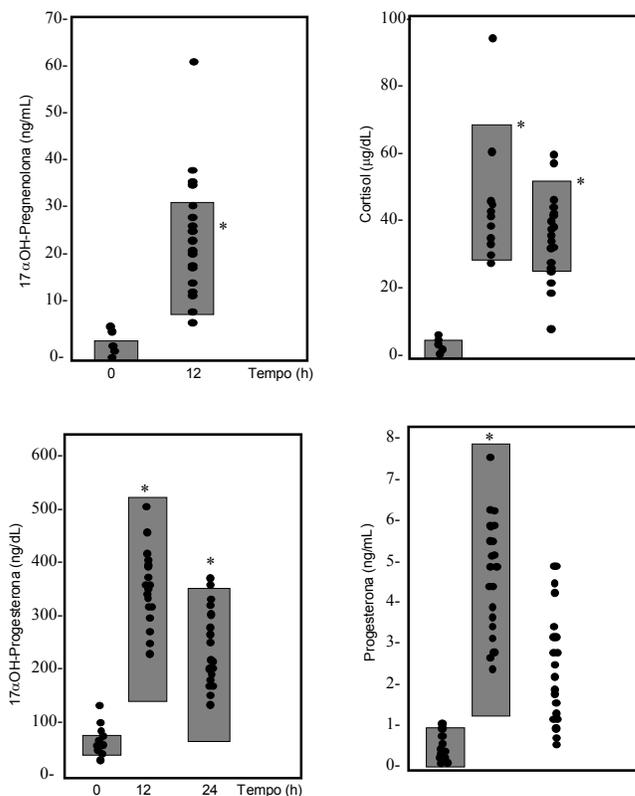


Figura 3 - Valores séricos de 17αOH-pregnenolona, cortisol, 17αOH-progesterona e progesterona antes e após estímulo com ACTH-depot. Os círculos representam os valores individuais de 26 pacientes hirsutas. A área sombreada representa um desvio-padrão ao redor da média de 13 controles.

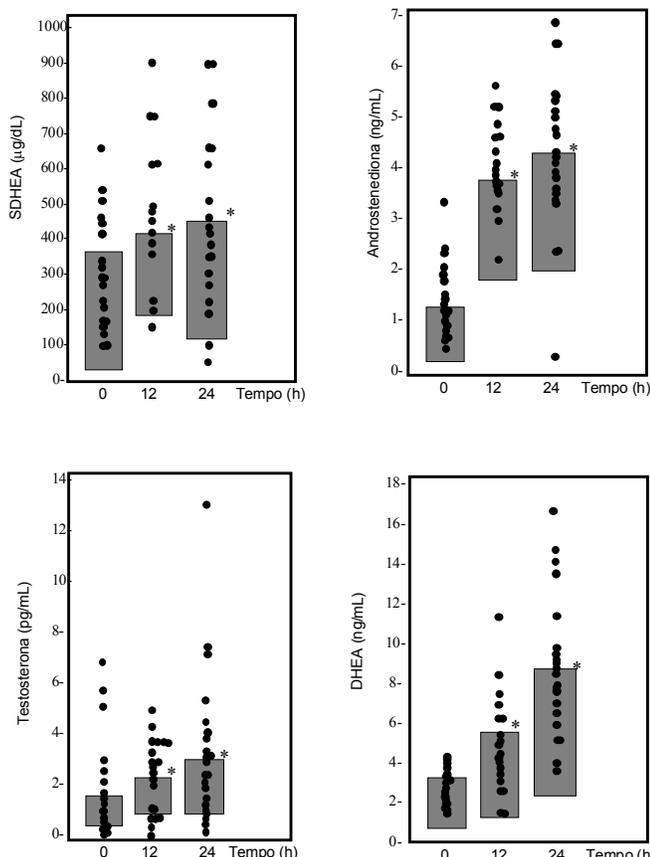


Figura 4 - Valores séricos de SDHEA, androstenediona, testosterona e DHEA antes e após estímulo com ACTH-depot. Os círculos representam os valores individuais de 26 pacientes hirsutas. A área sombreada representa um desvio-padrão ao redor da média de 13 controles.

Discussão

O hirsutismo idiopático constitui difícil desafio diagnóstico para ginecologistas e clínicos em geral. De 10 anos para cá, uma série de publicações tem alertado para a importância dos defeitos de síntese, nas suas formas tardias, como fatores etiológicos na determinação do hirsutismo e da anovulação crônica. Para o diagnóstico de defeito de 3β-HSD, Pang et al.²³, estabeleceram critérios diagnósticos na avaliação de vários hormônios, utilizando dois desvios-padrão acima dos níveis dos valores médios para indivíduos normais. Recentemente observou-se a presença de seqüências normais dos genes do tipo I e II em mulheres hirsutas tidas como deficientes da 3β-HSD por parâmetros hormonais, sugerindo que mulheres hirsutas com ou sem anovulação crônica, que apresentavam respostas alteradas ao teste com ACTH, tinham a atividade periférica da 3β-HSD normal^{24,25}. Este dado indicaria que este defeito poderia na realidade não existir e que a supressão da atividade desta enzima dever-se-ia à ação dos androgênios inibindo sua atividade, uma vez que esta ação há muito é conhecida¹. No entanto, estas mutações foram recentemente identificadas⁶.

Tabela 1 - Médias dos valores de 17 α -OH-pregnenolona (ng/mL), cortisol (mg/dL), 17 α -OH-progesterona (ng/dL), progesterona (ng/mL), SDHEA (mg/dL), androstenediona (ng/mL), testosterona livre (pg/mL), DHEA (ng/mL) e das relações 17 α -OH-pregnenolona/17 α -OH-progesterona, DHEA/androstenediona e 17 α -OH-pregnenolona/cortisol em mulheres hirsutas (Grupo I) e controles (Grupo II).

Hormônio	Grupo I			Grupo II		
	0	12	24	0	12	24
17 α -OH pregnenolona	2,0	24,6*	-	1,9	23,1*	-
Cortisol	2,1	45,3*	38,4	2,9	49,1*	42,5
17 α -OH progesterona	50,7	346,0*	218,0	38,4	348,4*	192,3
Progesterona	0,3	4,5*	2,2	0,4	4,8	11,5*
SDHEA	274,7	495,9	505,8*	196,7	278,3	316,4*
Androstenediona	1,2	4,0	4,5*	0,7	2,7	3,1*
Testosterona	1,3	1,8	2,7*	0,5	1,2	1,4*
DHEA	2,5	4,7	8,5*	1,8	3,6	5,7*
17 α -OH-pregnenolona/17 α -OH-progesterona	-	0,7	-	-	0,7	-
DHEA/androstenediona	-	-	1,9	-	-	1,5
17 α -OH-pregnenolona/cortisol	-	0,5	-	-	0,5	-

*p < 0,05

Por outro lado, também permanece vivo o interesse no diagnóstico dos defeitos de síntese de início tardio da 21OH. Neste trabalho encontramos uma paciente com defeito da 3 β -HSD, baseado em critérios adaptados de Pang et al.²³, e pelo menos duas pacientes com valores de progesterona várias vezes aumentados após ACTH, o que também poderia sugerir provável defeito de 21OH, uma vez que este hormônio também foi utilizado como marcador da atividade de 21OH⁷. Não observamos, entretanto, qualquer diferença de comportamento dos androgênios dosados nas pacientes hirsutas ou anovulatórias crônicas.

As dosagens isoladas de androgênios basais, principalmente de SDHEA, como marcadores de defeitos de síntese carecem de significado, como tende a mostrar a literatura recente^{14,24}, fato que também observamos no presente estudo ao encontrarmos pacientes com níveis de SDHEA aumentados e sem nenhuma alteração pós-estímulo com ACTH-*depot*, assim como mulheres com valores aumentados pós-estímulo e SDHEA normal, apesar de não serem portadoras de defeito de 21OH ou de 3 β -HSD.

Na ausência de testes genéticos, a necessidade do uso do ACTH diagnóstico ainda é imperiosa, pois os valores basais dos vários hormônios têm pouca importância no diagnóstico destes defeitos enzimáticos. Azziz e Zacur²⁶ afirmaram que doses entre 0.1 e 1 mg de ACTH promovem respostas supra-renais máximas. Entretanto, nos surpreendemos com a magnitude de respostas que o ACTH-*depot* impôs aos hormônios da supra-renal, além de estímulo a

todos os androgênios da zona reticular.

O aumento dos níveis dos androgênios pode se dever à conversão periférica de DHEA em androgênios, uma vez que em situações de acúmulo, esta conversão, que normalmente é pequena, passa a ter maior importância clínica²⁷.

Em relação ao padrão menstrual, a literatura mostra que pacientes eumenorréicas eram portadoras de defeitos de síntese^{13,23,28}. As alterações menstruais podem se dever a presença do defeito apenas no ovário destas pacientes e seriam causadas pela anovulação decorrente de hiperandrogenismo localizado no estroma ovariano.

Nossos resultados mostram que o teste com ACTH-*depot* pode ser usado como método diagnóstico para se triar mulheres hirsutas com ou sem anovulação com eventuais defeitos da esteroidogênese, à semelhança do teste venoso. Parece-nos lógica a realização do teste com ACTH-*depot*, haja vista o intenso estímulo que proporciona às zonas da supra-renal, especialmente à zona fasciculada, e também o aumento dos androgênios, o que se evidencia apenas em parte com teste o venoso. Lau²⁹, comparou os dois testes e verificou a semelhança dos seus resultados. Daí, sugerimos o emprego rotineiro do ACTH-*depot* para as pesquisas dos defeitos de síntese, particularmente na triagem dos defeitos da 21-OH, utilizando valor de normalidade até 1000 ng% após estímulo com ACTH. As dosagens hormonais devem ser realizadas 12 horas após a injeção da droga. Para a pesquisa do defeito de 3 β -HSD, utilizamos os seguintes valores: 17 α -OH-pregnenolona

lona >48,34 ng/mL, 17 α OH-pregnenolona/17 α OH-progesterona >1.37, DHEA >11,55 ng/mL, DHEA/androstenediona >2,6 e 17 α OH-pregnenolona/cortisol >0,87.

Portanto, ao se avaliar pacientes com hirsutismo idiopático, com ou sem anovulação crônica, reafirmamos que as dosagens basais dos androgênios são de valor limitado, ao passo que as que se fazem após teste com ACTH-*depot* podem auxiliar na identificação destes defeitos. Acreditamos que um estímulo mais potente sobre o córtex da supra-renal poderia ajudar a definir precisamente a existência ou não de deficiências enzimáticas, auxiliando o clínico no tratamento de pacientes hirsutas e especialmente na condução de mulheres anovulatórias crônicas.

SUMMARY

Purpose: *to test the adrenal function by a potent stimulus to its reticular layer verifying 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) and 21-hydroxylase (21OH) enzymatic activities.*

Methods: *plasma concentrations of 17 α OH-pregnenolone, 17 α OH-progesterone, cortisol, progesterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone (DHEA), dehydroepiandrosterone sulfate (SDHEA) and free testosterone were determined in 39 women, 13 of whom were normal (2 of them used in a pilot study) and 26 had idiopathic hirsutism, 0, 12 and 24 h after injection of ACTH-*depot*.*

Results: *among hirsute women, we identified different responses that could diagnose any blockage in the steroid pathways leading to the diagnosis of a mild/moderate decreased adrenal function. The 17 α OH-pregnenolone concentrations varied from 2.0 to 24.6 ng/mL, cortisol values increased from 2.1 to 45.3 and 38.4 μ g/dL, 17 α OH-progesterone levels varied from 50.7 to 346 and 218 ng/mL and progesterone increased from 0.3 to 4.4 and 2.2 ng/mL. Among the reticular layer hormones a rise of SDHEA from 274.7 to 495.5 and 505.8 mg/dL, and of androsterone from 1.1 to 4.0 and 4.5 ng/mL was observed, the levels of free testosterone increased from 1.3 to 1.8 and 2.7 pg/mL and the DHEA levels from 2.4 to 4.7 and 8.5 ng/mL. One patient showed 3 β -HSD deficiency and two others a possible 21OH deficiency.*

Conclusions: *these findings suggest that the ACTH-*depot* test could be used to exclude the adrenal gland as the possible source of hyperandrogenism in women with idiopathic hirsutism.*

KEY WORDS: *Hirsutism. ACTH. Adrenal hyperplasia.*

Agradecimentos

Ao Dr. Odilon Victor Porto Denardin, Professora Berenice Mendonça Bernadino, Professor Valdemar Hial, Dra. Patrícia Schram, Sra. Antônia Orneles Soares e às secretárias da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia da FMTM, pela sua imprescindível assistência.

Referências

1. Axelrod LR, Goldzieher JW, Ross D. Concurrent 3-HSD deficiency in adrenal and sclerocystic ovary. *Acta Endocrinol* 1965; 48:392-412.
2. Eldar-Geva T, Hurwitz A, Vecsei P, Palti Z, Milwidsky A, Rosler A. Secondary biosynthetic defects in women with late-onset congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 1990; 323:855-63.
3. The VL, Lachance Y, Labrie C, et al. Full length c-DNA structure and deduced amino acid sequence of human 3 β -hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase. *Mol Endocrinol* 1989; 3:1310-2.
4. Pang S. Genetics of 3 β -HSD disorder. *Grow Gen Horm* 1996; 12:5-9.
5. Schram P, Zerah M, Mani P, Jewelewicz R, Jaffe S, New MI. Nonclassical 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency: A review of our experience with 25 female patients. *Fertil Steril* 1992; 58:129-36.
6. Nayak S, Leep PA, Witchel SF. Variants of the type II 3 β -HSD gene in children with premature pubic hair and hyperandrogenic adolescents. *Mol Genet Metab* 1998; 64:184-92.
7. Kuhnle U, Chow D, Rapaport R, Pang S, Levine LS, New MI. The 21-hydroxylase activity in the glomerulosa and fasciculata of the adrenal cortex in congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 52:534-44.
8. Dupont E, Labrie F, The VL, Pelletier G. Immunocytochemical localization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:994-8.
9. Newmark S, Dluhy RG, Williams GH, Pochi P, Rose LI. Partial 11- and 21-hydroxylase deficiencies in hirsute women. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 127:595-8.
10. Gibson M, Lackritz R, Schiff I, Tulchinsky D. Abnormal adrenal responses to adrenocorticotrophic hormone in hyperandrogenic women. *Fertil Steril* 1980; 33:43-8.

11. Hawkins LA, Chasalow FI, Blethen SL. The role of adrenocorticotropin testing in evaluating girls with premature adrenarche and hirsutism/oligomenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:248-53.
12. Pang S, Lenore LS, Stoner E, et al. Non-salt congenital adrenal hyperplasia due to 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency with normal glomerulosa function. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 56:808-18.
13. Temeck JW, Pang S, Nelson C, New MI. Genetic defects of steroidogenesis in premature pubarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:609-17.
14. Brodie BL, Wentz AC. Late onset congenital adrenal hyperplasia: a gynecologist's perspective. *Fertil Steril* 1997; 48:175-88.
15. New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, et al. Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57:320-6.
16. Thomas AE, McKay DA, Cutlip MB. A monograph method for assessing body weight. *Am J Clin Nutr* 1976; 29:302-4.
17. Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1961; 21:1440-7.
18. Jung-Hoffmann C, Taubert HD, Kuhl, H. Direct radioimmunoassay of free testosterone in the evaluation of androgenetic manifestations in women. *Gynecol Endocrinol* 1987; 1:83-92.
19. Kubasik NP, Hallauer GB, Brodows RG. Evaluation of a direct solid phase radioimmunoassay for progesterone, useful for monitoring luteal function. *Clin Chem* 1984; 30:284-6.
20. Murphy BE. Some studies of the protein-binding of steroid and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein binding radioassay. *J Clin Endocrinol Metab* 1967; 27:973-90.
21. Siegel SF, Finegold DN, Lanes R, Lee PA. ACTH stimulation tests and plasma dehydroepiandrosterone sulfate levels in women with hirsutism. *N Engl J Med* 1990; 323:849-54.
22. Siegel S. *Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta*. 1ª ed. México: Trillas; 1975.
23. Pang S, Lerner AJ, Stoner E, et al. Late-onset adrenal steroid 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. I. A cause of hirsutism in pubertal and postpubertal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60:428-39.
24. Hatch R, Rosenfield RL, Kim MH, Tredway D. Hirsutism: implications, etiology and management. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 140:815-30.
25. Mebarki F, Sanchez R, Rheaume E, et al. Nonsalt-losing male pseudohermafroditism due to the novel homozygous N100s mutation in the type II 3 β -HSD gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:2127-34.
26. Azziz R, Zacur HA. 21 Hydroxylase deficiency in female hyperandrogenism: screening and diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69:577-84.
27. Kaufman FR, Stanczyk FZ, Matteri RK, Gentzsch E, Delgado C, Lobo RA. Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate metabolism in human genital skin. *Fertil Steril* 1990; 54:251-4.
28. Zerah M, Schram P, New MI. The diagnosis and treatment of nonclassical 3 β -HSD deficiency. *Endocrinol* 1991; 1:75-81.
29. Lau V. *Avaliação da esteroidogênese supra-renal de mulheres normais e hirsutas através dos testes de ACTH venoso e de depósito [dissertação]*. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1997.