

Doença de Addison de Etiologia Auto-Imune

revisão

RESUMO

A doença de Addison de etiologia auto-imune é uma endocrinopatia rara e potencialmente fatal, que pode ocorrer de forma isolada ou como parte das síndromes poliglandulares auto-imunes (SPA) dos tipo I e II. Auto-anticorpos anti-córtex adrenal são considerados marcadores imunológicos sensíveis do processo auto-imune destrutivo, podendo identificar indivíduos na fase pré-clínica da doença. A enzima 21-hidroxilase (citocromo P450c21) representa o principal antígeno adrenocortical, embora outros citocromos P450 (17 α -hidroxilase e colesterol desmolase) possam, também, desencadear a resposta auto-imune, principalmente na SPA do tipo I e na doença de Addison associada à falência ovariana precoce. O papel dos auto-anticorpos anti-P450c21 na patogênese da falência adrenal ainda não está bem estabelecido, assim como aquele dos anticorpos anti-receptor do ACTH. (*Arq Bras Endocrinol Metab* 1998;42/6:431-443).

Unitermos: Doença de Addison; Auto-imunidade; Auto-anticorpos; 21-Hidroxilase; Síndromes poliglandulares.

ABSTRACT

Autoimmune Addison's disease is a rare and potentially fatal endocrinopathy, that can occur either isolated or as part of the types I and II polyglandular autoimmune syndromes (PAS). Adrenocortical autoantibodies are considered sensitive immunological markers of the destructive autoimmune process, and can identify individuals in the pre-clinical stage of the disease. The steroidogenic enzyme 21-hydroxylase (P450c21) represents the major adrenal autoantigen, although other P450 cytochromes (17 α -hydroxylase and side chain cleavage) can also trigger an autoimmune response, mainly in the PAS type I and in Addison's disease with associated premature ovarian failure. The role of P450c21 autoantibodies in the pathogenesis of the adrenal failure is not yet well established, and the same happens with the anti-ACTH receptor antibodies. (*Arq Bras Endocrinol Metab* 1998;42/6:431-443).

Keywords: Addison's disease; Autoimmunity; Autoantibodies; 21-Hydroxylase; Polyglandular syndromes.

DOENÇA DE ADDISON

A INSUFICIÊNCIA ADRENOCORTICAL PRIMÁRIA CRÔNICA, originalmente descrita por Thomas Addison em 1855 (1), é uma endocrinopatia potencialmente fatal (2), com prevalência de 39 a 110 casos por milhão de habitantes (3-6). Resulta da destruição progressiva das células do córtex adrenal e se manifesta, predominantemente, como um quadro de insuficiência glico e mineralocorticóide (7,8) [tabela 1]. Pode ser causada por infecções fúngicas (paracoccidioidomicose, histoplasmose), bacterianas (tuberculose), virais (vírus da imunodeficiência adquirida, cito-

Regina C. Silva
Claudio E. Kater

Disciplina de Endocrinologia e Metabologia, Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo / Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP.

*Recebido em 07/08/98
Revisado em 19/09/98
Aceito em 17/10/98*

Tabela 1 - Manifestações clínicas e achados laboratoriais da insuficiência adrenocortical primária.

Cansaço, fraqueza
Anorexia, perda de peso
Tontura, hipotensão postural
Náusea, vômitos, diarreia, dor abdominal
Hiponatremia, hipercalemia, hipoglicemia, anemia normocítica, eosinofilia, linfocitose
Hiperpigmentação cutâneo-mucosa

Tabela 2 - Causas da insuficiência adrenocortical primária.

Início crônico	Início agudo
Auto-imune (isolada ou como parte da SPA I ou II)	Hemorragia adrenal
Tuberculose	Necrose ou trombose (septicemia)
Adrenoleucodistrofia	Uso de anti-coagulantes
Infecções fúngicas sistêmicas	Síndrome anti-fosfolípide
SIDA (infecções oportunistas)	
Carcinoma metastático, linfoma	

Modificado da referência 7.

megalovírus), metástases adrenais bilaterais (carcinoma de pulmão, rim e mama), adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X e processos auto-imunes (7-10) [tabela 2].

Atualmente, cerca de 65% a 90% dos casos de doença de Addison (DA) são de etiologia auto-imune (4,11,12) e podem ocorrer como entidade isolada ou, mais freqüentemente, estar associados a outras endocrinopatias auto-imunes, caracterizando as síndromes poliglandulares (SPAs) dos tipos I e II (13,14) [tabela 3].

SÍNDROME POLIGLANDULAR AUTO-IMUNE DO TIPO I

O diagnóstico da SPA do tipo I se baseia na presença de pelos menos dois dos seguintes critérios: can-

dídase mucocutânea crônica, hipoparatiroidismo e DA (13-17). Também podem fazer parte desta síndrome a distrofia do ectoderma, o hipogonadismo hipergonadotrófico, o vitiligo, a anemia perniciosa, a alopecia, as síndromes de má absorção e a hepatite crônica ativa (15,18). Doenças tireoidianas auto-imunes estão raramente presentes (11%) e, embora o diabetes mellitus do tipo 1 também seja pouco freqüente (4% a 12%), auto-anticorpos anti-GAD₆₅ podem ser demonstrados em 41% dos pacientes, mesmo na ausência de diabetes mellitus clinicamente manifesto (13,15,19).

A SPA do tipo I é extremamente rara, exceto na Finlândia, onde sua freqüência estimada é de aproximadamente 1/25.000 habitantes. Usualmente se manifesta na infância, ocorrendo esporadicamente ou entre irmãos (16,17). É herdada com padrão autossômico recessivo e, embora os primeiros estudos não tivessem encontrado uma ligação com o sistema HLA (human leucocyte antigen) de classe I ou II, posteriormente ficou estabelecido que o HLA-A28 é mais freqüente em pacientes que em controles normais e o HLA-A3 é mais freqüente nos portadores da síndrome que apresentam falência ovariana, quando comparados àqueles com função gonadal normal (16,20).

A colonização pela *Candida albicans* e a resposta auto-imune exagerada decorrem da diminuição da barreira mucosa e da função alterada das células T (21). O gene AIRE ("autoimmune regulator") responsável por esta síndrome localiza-se no braço longo do cromossomo 21 (21q22.3) e provavelmente codifica a produção de um fator imunomodulador (22,23). A mutação R257X (substituição de C por T, levando à troca de Arg 257 por um "stop codon") no gene AIRE está presente em 83% dos alelos da população finlandesa com SPA do tipo I (23).

Tabela 3 - Classificação das Síndromes Poliglandulares Auto-imunes (SPAs).

SPA I	SPA II	SPA III	SPA IV
Doença de Addison Hipoparatiroidismo Candidíase Mucocutânea	Doença de Addison Doença auto-imune tireoidiana Diabetes Mellitus do tipo 1	Doença auto-imune tireoidiana Diabetes mellitus do tipo 1 Anemia perniciosa, vitiligo e/ou alopecia	Alopecia e vitiligo Vitiligo e diabetes mellitus do tipo 1 Miastenia gravis e diabetes mellitus do tipo 1
<i>Crítérios</i> Pelo menos duas das três condições	Doença de Addison com pelo menos uma dessas doenças associadas	Ausência de Doença de Addison	Associações não incluídas nas outras categorias

Modificado da referência 14.

SÍNDROME POLIGLANDULAR AUTO-IMUNE DO TIPO II

A DA como parte da SPA do tipo II se manifesta entre os 20 e 60 anos de idade e se associa, fundamentalmente, às doenças tireoidianas auto-imunes (69%) e ao diabetes mellitus do tipo I (50%) (13). A associação com o hipotireoidismo primário é a mais prevalente (21% dos casos) e seu diagnóstico costuma ser feito concomitantemente ou após o desenvolvimento da DA (12). Diferentemente, o diabetes mellitus do tipo I costuma preceder o aparecimento da DA (17,24). Outras patologias auto-imunes não endócrinas também podem estar presentes nesta síndrome, como a doença celíaca, anemia perniciosa, vitiligo, alopecia e miastenia gravis (13,17).

A prevalência da SPA do tipo II é de cerca de 15 a 45 casos por milhão, sendo mais freqüente em mulheres (17, 24). A susceptibilidade genética para o desenvolvimento desta síndrome é herdada de forma autossômica dominante, com penetrância variável (24,25). Os genes responsáveis pela SPA do tipo II estão intimamente ligados a determinados alelos de risco nas classes I e II do sistema HLA, entre eles: B8 (26), DQA1*0501, DRB1*0301 e DQB1*0201, os quais são encontrados com maior freqüência nos pacientes que na população geral, mesmo na ausência de diabetes mellitus do tipo I (27-31).

O aminoácido existente na posição 57 do antígeno HLADQB1 (alanina, valina e serina, em substituição ao ácido aspártico) também pode se correlacionar com maior susceptibilidade para a DA, por possibilitar às células apresentadoras de antígenos a apresentação de populações mais diversas de peptídeos às células T, incluindo auto-antígenos (32).

Recentemente, o encontro de uma associação entre DA e um polimorfismo no gene ativo da 21-hidroxilase (33) ou uma deleção de 30 Kb na classe III do complexo maior de histocompatibilidade, envolvendo o gene C4A do complemento e o pseudogene da 21-hidroxilase (31), fez supor que certas forma de 21-hidroxilase pudessem ser mais imunogênicas que outras. No entanto, esses marcadores específicos para DA na classe III do complexo HLA estavam sempre em desequilíbrio de ligação com os determinantes de risco de classe II (DRB1*0301, DQA1*0501 e DQB1*0201), tanto nos pacientes como nos controles (33).

Possivelmente, a susceptibilidade para DA, pelo menos em um subgrupo de pacientes definido por alelos de risco HLADQA1, também possa ser influenciada por genótipos do CTLA4 (gene que codifica

o antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos ativados e que corresponde ao receptor da molécula co-estimulatória B7, responsável pela regulação da interação dos linfócitos T com as células apresentadoras de antígeno, além de mediar a apoptose antígeno-específica dos linfócitos T) (34).

PATOLOGIA

As glândulas adrenais de pacientes com DA de etiologia auto-imune são usualmente atroficas. Diferentemente do observado na DA secundária à tuberculose, o processo destrutivo auto-imune preserva a medula e altera a estrutura cortical. Em uma fase aguda, verifica-se a presença de extenso infiltrado de células mononucleares. Posteriormente, as poucas células adrenocorticais remanescentes vão sendo progressivamente substituídas por tecido fibroso (35,36).

Dados de autópsia de indivíduos com mais de 60 anos de idade e sem DA revelaram a presença de infiltrado de células mononucleares em 63% dos casos, com predomínio de linfócitos T CD4⁺ (24% deles ativados), o que pode refletir a ocorrência de auto-imunidade adrenal espontânea associada ao processo de envelhecimento ou a presença de adrenalite não destrutiva (37).

As células adrenocorticais de portadores de DA de etiologia auto-imune de início recente (um dia a oito semanas) expressam de forma aberrante os antígenos de classe II do sistema HLA, o que as permite apresentarem antígenos ao sistema imune (38). Não está estabelecido, no entanto, se isso representa um evento primário ou se é decorrente do estímulo inespecífico do interferon γ , liberado pelo processo inflamatório (38). Da mesma forma, cabe ressaltar que cerca de 10% das células adrenocorticais normais da zona reticulada podem expressar de forma espontânea esses mesmos determinantes antigênicos (38).

A análise histopatológica fornece o diagnóstico de certeza da etiologia auto-imune da DA. No entanto, a biópsia glandular é raramente realizada na prática clínica, por ser um procedimento invasivo. Os achados tomográficos ou de ressonância magnética de glândulas supra-renais normais ou com volume reduzido e sem calcificações permitem diferenciar a DA de etiologia auto-imune daquela resultante de outras etiologias, principalmente as doenças granulomatosas (39-42).

ASPECTOS DA IMUNIDADE CELULAR

Embora ainda pouco estudado, é amplamente aceito que as células T são fundamentais na patogênese da

DA de etiologia auto-imune. À semelhança do que ocorre no diabetes mellitus do tipo I, acredita-se que a ativação de linfócitos T "helper" (CD4+) auto-reativos desempenhe um papel crítico nos estágios precoces da doença, levando à destruição celular através da ação de linfócitos T citotóxicos (CD8+). Em uma fase tardia, a liberação de citocinas pelos linfócitos CD4+ e conseqüente geração de radicais livres de oxigênio colaborariam para a manutenção do processo destrutivo inflamatório tecidual (43). Os fatores ambientais também podem modular a resposta imune através de uma ativação predominante de subpopulações de linfócitos CD4+ Th1 (secretoras de interleucina-2, fator de necrose tumoral- β e interferon- γ) sobre as populações Th2 (produtoras de interleucinas 4, 5 e 10), o que tem sido implicado no maior estímulo da imunidade mediada por células em relação à humoral (44). Os linfócitos T supressores de pacientes com DA também são menos eficientes na inibição das células B e T (45).

Evidência de uma resposta antígeno-específica do linfócito T pode ser demonstrada pelo teste de inibição da migração de leucócitos, que é um correlato *in vitro* da hipersensibilidade celular do tipo tardio. Quarenta e seis a 80% dos portadores de DA de etiologia auto-imune apresentam macrófagos com menor capacidade de migração na presença de antígenos adrenais (devido à liberação dos inibidores de migração, interferon γ e interleucina 4, pelos linfócitos T estimulados), quando comparados a leucócitos de indivíduos normais ou com adrenalite secundária a tuberculose (46-49).

Estudos mais recentes, utilizando proteínas adrenais purificadas e separadas de acordo com seu tamanho, mostraram uma resposta proliferativa dos linfócitos T frente a uma fração contendo proteínas de peso molecular entre 18 e 24 kDa em 60% dos casos de DA de etiologia auto-imune (50). Reforçando o conceito do envolvimento das células T na patogênese da DA de etiologia auto-imune, observou-se que o número relativo de linfócitos T ativados é duas a dez vezes maior em 100% dos pacientes com doença recém-diagnosticada (menos de um ano), quando comparado ao número encontrado em controles saudáveis ou em portadores de DA de etiologia diferente da auto-imune, sugerindo processo auto-imune em atividade. Entretanto, pacientes com DA auto-imune com duração superior a cinco anos apresentam níveis normais de linfócitos T ativados circulantes (51).

Em modelos animais, adrenalite auto-imune pode ser produzida pela imunização de camundongos com mistura de extrato de adrenal e lipopolissacáride de *Klebsiella pneumoniae* O3. Além disso, há aparecimen-

to de anticorpos anti-córtex adrenal e o desenvolvimento de hipersensibilidade celular tardia. A transferência de esplenócitos dos camundongos imunizados com extrato de adrenal também ocasiona tanto o desenvolvimento de infiltrados no córtex adrenal como o aparecimento de anticorpos em receptores saudáveis, mas sem desencadear insuficiência adrenal. Isso indica que as lesões adrenais são induzidas através de mecanismo auto-imune e que a imunidade mediada por células desempenha um papel importante na produção dessas lesões (52).

A caracterização, isolamento e clonagem das células do infiltrado inflamatório permitirão, no futuro, a identificação dos auto-epitopos das células T e uma melhor compreensão dos mecanismos celulares envolvidos na patogênese da DA de etiologia auto-imune.

ASPECTOS DA IMUNIDADE HUMORAL

AUTO-ANTICORPOS ANTI-CÓRTEX ADRENAL E ANTI-CÉLULAS PRODUTORAS DE ESTERÓIDES

A demonstração de auto-anticorpos anti-córtex adrenal (ACA) circulantes, através de fixação de complemento e imunofluorescência indireta (IFI), foi o primeiro passo importante para a definição da etiologia auto-imune da DA (53,54).

OS ACA são imunoglobulinas da classe G, convencionalmente detectadas através de IFI, em cortes criostáticos de adrenal humana ou bovina (55). Estão presentes no soro de 60% a 80% dos portadores de DA de etiologia idiopática (12,56-59), principalmente em pacientes do sexo feminino e nos portadores de SPA (60,61). Sua positividade costuma ser maior quanto menor a duração da doença. De acordo com Wuepper e cols (57), 89% dos pacientes estudados dentro de dois anos do diagnóstico têm ACA circulantes, comparados a 50% dos pacientes com mais de dois anos de duração da DA. Nerup (59) também encontrou ACA com frequência significativamente maior no soro de pacientes com menos de cinco anos de duração da doença (83% vs 58%). Da mesma forma, Falorni e cols (62) demonstraram a presença de ACA em 73% dos pacientes com menos de 15 anos de duração da DA, comparado a 8% nos pacientes com diagnóstico há mais de 15 anos.

Além da IFI, outras técnicas podem ser utilizadas para a detecção dos ACA, entre elas: a ELISA (63), o radioimunoensaio (64) e a técnica da proteína-A imunoperoxidase (PAIP) (65). Esta última, além de apresentar sensibilidade e especificidade comparáveis à IFI, tem as vantagens de dispensar o uso do microscópio de imunofluorescência e de permitir o estoque das lâmi-

nas por tempo prolongado (65). Tanto a técnica de IFI como a PAIP são semiquantitativas e sofrem interferência da qualidade do tecido adrenocortical utilizado, da habilidade do pesquisador e da presença no soro de lipemia e anticorpos anti-mitocondriais ou anti-ribossomais, fatores que podem tornar difícil a diferenciação entre um título fraco positivo e um negativo ("background") (63,65).

Um subgrupo dos ACA apresenta reação cruzada com antígenos compartilhados por outras células produtoras de esteróides presentes nos ovários (células da teca interna, hilares e luteinizadas), testículos (células de Leydig) e placenta (trofoblastos), sendo denominados anticorpos anti-células produtoras de esteróides (ACPE) (11,66-68). Os ACPE são raramente encontrados na ausência dos ACA (69). Estão presentes em 15% a 20% das pacientes com DA, sendo que 40% delas evoluem para falência ovariana em um período de 10 a 15 anos (70). São também detectados no soro de 71% a 86% dos portadores de SPA do tipo I, correlacionando-se fortemente com a presença de falência ovariana precoce (71,72).

Tanto os ACA como os ACPE são raramente encontrados na população geral (59,69,73). Os ACA ocorrem em 10 a 30% dos casos de hipoparatiroidismo idiopático e são um achado ocasional no soro de diabéticos do tipo I e portadores de doenças auto-imunes tireoidianas (11,74). Quando detectados na ausência de DA clínica, esses anticorpos funcionam como marcadores de falência glandular em potencial, principalmente se fixadores de complemento (75) e se detectados de forma persistente no plasma em títulos superiores a 1:8 (74,76).

A evolução para falência glandular passa por quatro estágios funcionais diferentes, sendo que a elevação da atividade plasmática da renina é a primeira anormalidade detectada, seguida de resposta subnormal do cortisol frente ao estímulo com ACTH exógeno, aumento dos níveis de ACTH e, finalmente, diminuição dos níveis plasmáticos de cortisol (77). No entanto, remissão espontânea pode ocorrer em 30% dos portadores de doenças auto-imunes órgão-específicas e ACA em títulos inferiores a 1:8, especialmente nos estágios precoces da insuficiência adrenocortical subclínica. Da mesma forma, reversibilidade da disfunção adrenal também pode ser induzida por corticoterapia em dose imunossupressora, apesar dos altos títulos de ACA (1:32 a 1:64), mesmo em pacientes em estágios mais avançados da insuficiência adrenocortical subclínica (74).

Os ACA estão usualmente ausentes no soro de portadores de DA de etiologia granulomatosa, embora haja relatos do encontro de ACA em 7% a 18% dos portado-

res de DA secundária à tuberculose (78,79), provavelmente devido à liberação de antígenos provocada pela resposta inflamatória ou à existência de dois mecanismos separados de lesão agindo simultaneamente.

AUTO-ANTÍGENOS NA DOENÇA DE ADDISON (tabela 4)

O antígeno-alvo dos ACA localiza-se no citoplasma das células das três camadas do córtex adrenal. A nível subcelular, a fração microsomal absorve de forma quantitativa o anticorpo do soro testado, embora também haja relatos de reação com a fração mitocondrial (80). Reatividade contra a superfície celular também foi demonstrada através de imunofluorescência de superfície em células adrenais intactas, havendo correlação entre anticorpos reativos contra o citoplasma e aqueles dirigidos contra a membrana citoplasmática (81). A ligação dos ACA a frações subcelulares ricas em citocromo c-redutase e 5'-nucleotidase (marcadores do microsoma e da membrana plasmática, respectivamente) também sugere que o antígeno possa estar representado na membrana plasmática (82,83).

Tabela 4 - Auto-antígenos adrenais nas diferentes formas de doença de Addison.

Doença	Auto-antígeno adrenal
Doença de Addison isolada	21-hidroxilase
SPA do tipo II	21-hidroxilase
SPA do tipo I	21-hidroxilase, 17 α -hidroxilase e colesterol desmolase
Doença de Addison + Falência ovariana precoce	17 α -hidroxilase, colesterol desmolase e 21-hidroxilase

Em 1988, Furmaniak e cols (84) demonstraram que 57% dos soros de portadores de DA de etiologia auto-imune e ACA positivo à IFI, imunoprecipitavam especificamente uma proteína adrenal microsomal de 55KDa, sob condições reduzidas, e uma de 58 KDa, sob condições não reduzidas. Posteriormente, a enzima 21-hidroxilase (P450c21) foi identificada como o principal antígeno na DA de etiologia auto-imune isolada e naquela associada à SPA do tipo II. Winqvist e cols, em 1992 (85), observaram que o soro ACA positivo de 12 de 16 (75%) portadores de DA de etiologia auto-imune isolada e de início na idade adulta reconheciam, no "immunoblotting" uma proteína da fração microsomal de adrenal bovina de 54 KDa, a qual migrava na eletroforese na mesma posição da P450c21. Da mesma forma, tanto os soros de portadores de DA de etiologia auto-imune isolada como os

anticorpos de coelho anti-P450c21 recombinante reagem especificamente com uma proteína adrenal de 55 KDa e com a P450c21 humana recombinante expressa em *Saccharomyces cerevisiae* ou com a P450c21 nativa purificada (86).

A P450c21 é uma enzima exclusiva do córtex adrenal, codificada por um gene localizado no cromossomo 6, na classe III do sistema HLA. Tem peso molecular de 55 KDa e é constituída de 494 aminoácidos (87). Localiza-se no retículo endoplasmático e necessita de uma redutase dependente de NADPH para a sua atividade. Converte 17-hidroxiprogesterona em 11-deoxicortisol e progesterona em deoxicorticosterona (88). Mapeamento dos epitopos aos quais os auto-anticorpos anti-P450c21 se ligam foi possível através da expressão de fragmentos da P450c21, usando translação *in vitro* ou expressão bacteriana da enzima. Esses estudos indicaram que a reatividade dos anticorpos é restrita a sítios limitados da proteína. Em 90% dos casos, os anticorpos reconhecem a porção central da proteína (aminoácidos 165 a 379), sendo predominante o reconhecimento do epitopo localizado entre os resíduos 281 e 379, onde se situa o sítio de ligação de esteróide (aminoácidos 342 a 358). Além disso, em metade dos casos, os anticorpos reagem com a porção carboxi-terminal (aminoácidos 380 a 494), a qual inclui o sítio de ligação do heme, conservado em todas as enzimas citocromo P450 (32,89,90). Até mesmo alterações únicas de aminoácidos, no sítio de ligação esteróide ou heme, afetam marcadamente a ligação dos auto-anticorpos humanos, conforme demonstrado quando diferentes mutações que ocorrem normalmente na P450c21 (na hiperplasia adrenal congênita não clássica) foram testadas (Arg339^{His}: redução de 15% e Pro453^{Ser}: redução superior a 40%) (91). Tanaka e cols (92) observaram redução de 50% na ligação dos auto-anticorpos anti-P450c21 após a produção de mutações na Cys 428 (para Ser, Arg e Phe); também, a mutação que ocorre naturalmente na Ile 172 (para Asn) causou redução de cerca 20% na ligação dos anticorpos (92). De acordo com Wedlock e cols (89), os segmentos central e carboxi-terminal da P450c21 interagem para formar um epitopo conformacional (tridimensional), o qual é muito conservado e importante para a atividade enzimática. Há, dessa forma, uma pressão evolutiva para conservar seqüências de aminoácidos críticas para a atividade enzimática, apesar delas facilmente provocarem respostas auto-imunes indesejáveis.

Recentemente, Volpato e cols (93), estudando os epitopos reconhecidos por auto-anticorpos anti-P450c21, não observaram diferenças no padrão de

reatividade em pacientes com DA isolada ou com SPA dos tipos I e II e em indivíduos com auto-anticorpos e função adrenal normal ou DA subclínica, sugerindo que os soros de pacientes com diferentes formas de DA auto-imune também reconhecem os mesmos epitopos da região carboxi-terminal e central da P450c21. Isso difere do observado com os auto-anticorpos anti-GAD₆₅, os quais são reativos contra diferentes epitopos em portadores de diabetes mellitus do tipo I, quando comparados aos portadores de "stiff-man syndrome" e SPA do tipo I (94).

A natureza dos ACPE também foi elucidada quando, após reação de uma biblioteca de cDNA de adrenal fetal com o soro de portadores de SPA do tipo I houve reconhecimento, no "immunoblotting", de uma proteína de peso molecular 55 KDa, a qual apresentava 99% de homologia com a enzima 17 α -hidroxilase (P450c17) (95). Esta enzima está presente no retículo endoplasmático do córtex adrenal e gônadas (88). Quatro epitopos distintos foram encontrados: ER1 (aminoácidos 122-148), ER2 (aminoácidos 280-304), ER3 (aminoácidos 396-432) e ER4 (aminoácidos 466-508) (96). Nos últimos 70 a 80 aminoácidos da proteína localiza-se a região que inclui o sítio catalítico e a cisteína, essencial para o funcionamento de todos os citocromos P450 por se ligar ao grupo heme (95).

Posteriormente, verificou-se que o soro de portadores de SPA do tipo I também reagiam no "immunoblotting" com uma proteína de 53 KDa da fração mitocondrial da adrenal bovina, a qual além de migrar na mesma posição da colesterol desmolase (*side chain cleavage*, P450scc) também era reconhecida por anticorpo de coelho anti-P450scc (97). A P450scc está presente no córtex adrenal, gônadas e placenta e requer uma adrenodoxina, adrenodoxina redutase e NADPH para sua atividade (88).

A homologia de apenas 16% na seqüência de aminoácidos entre a P450c17 e a P450scc (97) e o fato de que o anticorpo anti-P450scc cora a zona glomerulosa na IFI, diferentemente do anticorpo anti-P450c17 (a qual não é expressa na zona glomerulosa), falam contra a hipótese de que haveria uma reatividade cruzada entre a P450c17 e a P450scc na SPA do tipo I e sugerem uma resposta imune heterogênea nesta síndrome (98). Dessa forma, os anticorpos anti-P450c17 e P450scc se constituem nos principais componentes dos ACPE (99).

Na SPA do tipo I, também foi descrita uma resposta anticorpal contra a P450c21 (99). De acordo com Uibo e cols (98), na SPA do tipo I (com DA), cerca de 80% dos soros reagem contra uma ou mais das três enzimas citocromo P450.

A P450c21 e a P450c17 são enzimas citocrômicas localizadas no retículo endoplasmático, com pesos moleculares semelhantes e cerca de 30% de homologia na seqüência de aminoácidos (principalmente nas regiões catalíticas situadas na região carboxi-terminal) (96,100). No entanto, em estudos de absorção, a ausência de reatividade cruzada entre os anticorpos para uma seqüência comum das duas enzimas suporta a idéia de uma resposta imune independente para cada citocromo P450 e sugere que cada enzima seja o alvo primário da imunidade humoral na SPA do tipo I (101).

Os diversos estudos realizados até o momento indicam que a P450c21 é o principal auto-antígeno na DA de etiologia auto-imune, independentemente de ser isolada ou associada às SPAs dos tipos I e II. Qualquer um dos três citocromos P450 pode desencadear o aparecimento da DA na SPA do tipo I, embora a P450c21 pareça particularmente crítica para o desenvolvimento da DA isolada e aquela associada à SPA do tipo II (102).

Aproximadamente 20% dos soros de portadores de DA de etiologia idiopática não apresentam reatividade contra nenhuma das três enzimas citocromo P450 (102). Embora não tenha sido detectada reatividade contra outras enzimas, tais como a 11- β -hidroxilase, a aromatase, a adrenodoxina e a 3 β -hidroxiesteróide dehidrogenase, a hipótese de que existam auto-antígenos adicionais ainda não identificados não pode ser descartada (101, 103). Um antígeno de 51KDa, localizado no retículo endoplasmático das células da granulosa e placenta, foi reconhecido pela maioria dos soros de portadores de DA e ACPE positivos (104). Uibo e cols (105) também observaram que o soro de portadores de SPA do tipo I identifica uma proteína adrenal de 43 KDa ainda não identificada. Da mesma forma, síntese de auto-anticorpos localizada, sem evidência sorológica, e duração da doença devem ser levadas em consideração na tentativa de explicar esses casos onde nenhum anticorpo pode ser detectado (102).

AVANÇOS DIAGNÓSTICOS

A identificação dos auto-antígenos adrenocorticais possibilitou o desenvolvimento de técnicas mais específicas e sensíveis para o diagnóstico da DA de etiologia auto-imune, tais como os radioensaios. Nestes, o DNA complementar (cDNA) das enzimas esteroideogênicas humanas é utilizado em uma reação de transcrição/translação acopladas *in vitro*, em reticulócitos de coelho, onde se adiciona um aminoácido marcado com o isótopo radioativo (³⁵S-metionina).

Posteriormente, as enzimas humanas recombinantes marcadas são imunoprecipitadas com o soros dos pacientes e as proteínas ligadas aos anticorpos são separadas das proteínas livres através da adição de proteína-A separam-se. A radioatividade é quantificada em um contador de líquido de cintilação (99,106,107). Essa técnica é quantitativa, apresenta boa reprodutibilidade e especificidade e sensibilidade elevadas (devido ao uso do isótopo radioativo). A utilização de uma placa com 96 poços para a imunoprecipitação permite a análise simultânea de grande número de soros. A translação eucariótica possibilita a manutenção do epítipo conformacional e de possíveis modificações pós-translacionais, diferentemente do observado com enzimas expressas em bactérias. Os resultados são expressos como índices relativos, utilizando-se um padrão positivo e dois negativos, a fim de diminuir a variação inter-ensaio. As únicas limitações estão associadas com o uso de DNA e de material radioativo, o que implica num maior controle do ambiente, a fim de evitar contaminação.

Um novo radioensaio, baseado na utilização de P450c21 humana recombinante expressa em *Saccharomyces cerevisiae* e marcada com ¹²⁵I pelo método da cloramina T, foi desenvolvido por Tanaka e cols (108), os quais obtiveram resultados comparáveis aos dos ensaios citados anteriormente.

Auto-anticorpos anti-P450c21 detectados por radioensaio apresentam boa correlação com aqueles detectados através de "immunoblotting" e com os ACA detectados por IFI. Diferentemente do "immunoblotting", no entanto, não existe o risco de desnaturar o antígeno e alterar o epítipo conformacional ao qual o anticorpo se liga. Não houve reação cruzada com outros anticorpos presentes no soro, tais como fator reumatóide, anticorpos anti-DNA de dupla fita, anti-receptor do TSH, anti-tiroglobulina, anti-peroxidase e anti-GAD₆₅ (106).

Auto-anticorpos anti-P450c21 são raramente encontrados na população geral (1,4% a 2,5%) (107,108) e a sua prevalência em portadores de DA de etiologia auto-imune isolada varia de 64% a 89% (99,106-108). Os níveis de auto-anticorpos anti-P450c21 costumam se correlacionar inversamente com a duração da falência adrenocortical de etiologia auto-imune: 100% dos pacientes com menos de 20 anos de duração da doença foram positivos, comparados a 67% dos pacientes com mais de 20 anos de duração da doença (107). Também, os auto-anticorpos anti-P450c21 são mais sensíveis que os ACA detectados por IFI em pacientes com mais de 15 anos de duração da DA (62).

PAPEL DOS AUTO-ANTICORPOS ANTI-P450c21 NA PATOGÊNESE DA FALÊNCIA ADRENAL

O papel dos auto-anticorpos anti-P450c21 na patogênese da insuficiência adrenocortical primária não está bem estabelecido. É difícil imaginar anticorpos que possam reagir com antígenos intra-celulares em células intactas, mas se deve levar em consideração a possibilidade da expressão auto-antigênica na superfície celular, principalmente como resultado de um estresse como o que ocorre durante infecções virais (32). Além do mais, há relatos da expressão antigênica na superfície celular, o que talvez permita aos auto-anticorpos atuar na patogênese da falência adrenocortical, através de citotoxicidade humoral mediada pelo complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpos, através das células *killer* (81,82).

Estudos *in vitro* demonstraram que esses auto-anticorpos são capazes de inibir a função enzimática (menor conversão de progesterona a deoxicorticosterona) (109). No entanto, não foi possível demonstrar a inibição da atividade enzimática *in vivo*, pois pacientes com DA subclínica e auto-anticorpos positivos não apresentam nenhum acúmulo de 17-hidroxiprogesterona (indicador bioquímico da deficiência enzimática na hiperplasia adrenal congênita) (110,111). Portanto, parece que a destruição das células adrenocorticais mediada pelos linfócitos T é central na patogênese da DA de etiologia auto-imune e que a produção de auto-anticorpos anti-P450c21 é secundária à liberação de P450c21 e peptídeos a ela relacionados. Dessa forma, os auto-anticorpos anti-P450c21 funcionam apenas como marcadores sorológicos do processo auto-imune (epifenômeno), apesar de se ligarem a sítios importantes para a atividade enzimática. Laureti e cols (112), entretanto, observaram que os níveis de auto-anticorpos anti-P450c21 se correlacionam com o grau de disfunção adrenal em indivíduos com insuficiência adrenal pré-clínica; isto sugere que a produção de altos níveis de anticorpos está associada com a ativação de uma fase destrutiva irreversível do processo auto-imune, e que os auto-anticorpos anti-P450c21 são o resultado de um processo seletivo, oligoclonal e epitopo-específico capaz de gerar auto-anticorpos de alta afinidade pelo antígeno. Além disso, a ausência de reatividade do soro de portadores de SPA do tipo I contra a 11 β -hidroxilase, a aromatase, a adrenodoxina e a 3 β -hidroxiesteróide dehidrogenase (101), também fala contra o fato da imunidade humoral ser ineficaz.

VALOR PROGNÓSTICO DOS AUTO-ANTICORPOS ANTI-P450c21, ANTI-P450c17 E ANTI-P450sc

Devido à possibilidade de ocorrência de múltiplas endocrinopatias auto-imunes no mesmo paciente, torna-se necessária a identificação precoce de indivíduos de risco para o desenvolvimento de DA, através da dosagem de auto-anticorpos anti-P450c21.

Auto-anticorpos anti-P450c21 são detectados, através de radioensaio, em 0,6 a 2,3% dos portadores de diabetes mellitus do tipo 1, sendo altamente sensíveis e específicos para o diagnóstico de DA (62,113). Esses auto-anticorpos também são detectados em 3% dos portadores de moléstia de Basedow Graves, apresentando um valor preditivo positivo para o diagnóstico de DA superior a 60% (62).

De acordo com Betterle e cols (114), 90% das crianças portadoras de endocrinopatias auto-imunes e auto-anticorpos anti-P450c21 positivos evoluem para falência adrenal após um período médio de latência de três anos e a progressão de pacientes do estágio zero (função adrenal normal) para DA clínica é rápida (14 meses). Diferentemente, 21% dos adultos portadores de endocrinopatias auto-imunes e auto-anticorpos anti-P450c21 positivos evoluem para DA clínica após um período médio de latência de três anos, mas a progressão do estágio zero para o estágio quatro (DA clínica) é mais lenta, ocorrendo em cerca de cinco anos (115). Em adultos, altos níveis de auto-anticorpos anti-P450c21, função adrenal alterada na época da detecção do anticorpo e HLA-DR3 estão associados com maior progressão para DA clínica (115). Betterle e cols (115) recomendam a realização anual do teste de estímulo rápido com ACTH e a introdução de terapia substitutiva já no primeiro estágio de disfunção adrenal (aumento da atividade plasmática da renina), a fim de prevenir crise adrenal aguda nesses pacientes, principalmente durante um estresse ou infecção. A terapia substitutiva com glicocorticóides pode ser utilizada de forma profilática, para reduzir a função das células adrenocorticais e a expressão antigênica, de forma a lentificar ou até mesmo interromper o processo auto-imune, retardando o início clínico da doença. Além disso, terapia imunossupressora ou imunomoduladora também pode ser usada na tentativa de se bloquear o processo auto-imune, restituindo a função do órgão-alvo (32).

Os auto-anticorpos anti-P450c17 e P450sc constituem-se em marcadores sorológicos de falência gonadal em mulheres, mas não em homens, sendo o testículo mais resistente à destruição auto-imune, possivelmente devido à proteção oferecida pela barreira

hêmato-testicular, bem como devido a fatores genéticos e hormonais (30,104).

ANTICORPOS ANTI-RECEPTOR DO ACTH

Existem anticorpos contra receptores hormonais ou determinantes antigênicos intimamente relacionados com esses receptores, os quais podem bloquear a ação hormonal e corroborar na patogênese da DA de etiologia auto-imune (83).

Anticorpos anti-receptor do ACTH podem bloquear a síntese de DNA e/ou o estímulo da produção de cortisol pelo ACTH, antes da geração do AMP cíclico, sem um efeito direto citopático (116). Podem, também, agir conjuntamente com os ACA e a imunidade celular, afetando o trofismo glandular (117). Especificamente, IgGs que bloqueiam a ação do ACTH estimuladora do crescimento adrenal foram detectadas em 80% dos portadores de DA de etiologia auto-imune, enquanto que IgGs bloqueadoras dos efeitos esteroidogênicos do ACTH foram detectadas em 74% dos casos (83,117). Esses dados, no entanto, não foram confirmados em outros estudos (118).

CONCLUSÕES

Na maioria dos casos, a DA resulta da destruição auto-imune das células do córtex adrenal. Os ACA correspondem a marcadores sensíveis e específicos desse processo auto-imune destrutivo, sendo úteis para a identificação de indivíduos de risco para o desenvolvimento de falência adrenal. A enzima P450c21 foi recentemente identificada como o principal auto-antígeno na DA de etiologia auto-imune, embora outros citocromos P450 (P450c17 e P450scc) também possam desencadear o processo auto-imune, principalmente na SPA do tipo I e na DA associada à falência ovariana precoce. Apesar desses auto-anticorpos se ligarem a sítios importantes para a atividade enzimática, seu papel na patogênese da falência adrenal ainda não está bem estabelecido e a maioria dos estudos aponta para uma atuação predominante dos linfócitos T citotóxicos, causando destruição das células adrenocorticais e subsequente falência glandular.

A descoberta de novos determinantes genéticos, dentro ou fora do sistema HLA, os quais predispõem à perda da tolerância imunológica e ao aparecimento da auto-imunidade anti-adrenocortical ainda se faz necessária. A detecção precoce de auto-anticorpos anti-P450c21, anti-P450c17 e anti-P450scc, somada à melhor compreensão dos mecanismos etiopatogênicos, certamente permitirão, num futuro próximo, a

introdução de terapias isohormonais ou imunoterapias preventivas específicas.

REFERÊNCIAS

1. Addison T. On the constitutional and local effects of disease of the suprarenal capsules. **Med Classics** 1937; 2: 244-293.
2. Ringstad J, Rodge S, Loland W, Rode L. Case report. Rapidly fatal Addison's disease: three case reports. **J Intern Med** 1991; 230: 465-467.
3. Stuart-Mason A, Meadde TW, Lee JAH, Morris JN. Epidemiological and clinical picture of Addison's disease. **Lancet** 1968; 2: 744-747.
4. Nerup J. Addison's disease – a review of some clinical, pathological and immunological features. **Dan Med Bull** 1974; 21: 201-217.
5. Willis AC, Vince FP. The prevalence of Addison's disease in Coventry, UK. **Postgrad Med J** 1997; 73: 286-288.
6. Kong MF, Jeffcoat W. Eighty-six cases of Addison's disease. **Clin Endocrinol** 1994; 41: 757-761.
7. Oelkers W. Adrenal insufficiency. **N Engl J Med** 1996; 335: 1206-1212.
8. Kater CE, Faiçal S, Zanella MT. Como reconhecer e tratar a insuficiência adrenocortical. **J Bras Med** 1993; 64: 168-170.
9. Colombo AL, Faiçal S, Kater CE. Systematic evaluation of the adrenocortical function in patients with paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia** 1994; 127: 89-93.
10. Lewi DS, Kater CE. Insuficiência adrenalocortical em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS). **Rev Assoc Med Brasil** 1988; 34: 213-218.
11. Irvine WJ, Barnes EW. Addison's disease, ovarian failure and hypoparathyroidism. **Clin Endocrinol Metab** 1975; 4: 379-434.
12. Zelissen PMJ, Bast EJEG, Croughs RJM. Associated autoimmunity in Addison's disease. **J Autoimmunity** 1995; 8: 121-130.
13. Neufeld M, Maclaren NK, Blizzard RM. Two types of autoimmune Addison's disease associated with different polyglandular autoimmune (PGA) syndromes. **Medicine** 1981; 60: 355-362.
14. Neufeld M, Maclaren N, Blizzard R. Autoimmune polyglandular syndromes. **Pediatr Annals** 1980; 9: 154-163.
15. Ahonen P, Myllärniemi S, Sipilä I, Perheentupa J. Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy – candidiasis – ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients. **N Engl J Med** 1990; 322: 1829-1836.
16. Betterle C, Greggio NA, Volpato M. Autoimmune Polyglandular Syndrome type I. **J Clin Endocrinol Metab** 1998; 83: 1049-1055.
17. Betterle C, Volpato M. Adrenal and ovarian autoimmunity. **Eur J Endocrinol** 1998; 138: 16-25.
18. Hayashida CY, Toledo SPA, Barros MT, EzabellaMCL, Laudanna AA. Síndrome poliglandular autoimune do tipo I com hipoparatiroidismo, candidíase mucocutânea e malabsorção intestinal. **Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo** 1990; 45: 24-28.

19. Tuomi T, Björsees P, Falorni A, Partanen J, Perheentupa J, Lernmark A, et al. Antibodies to glutamic acid decarboxylase and insulin-dependent diabetes in patients with autoimmune polyendocrine syndrome type I. **J Clin Endocrinol Metab** 1996; 81: 1488-1494.
20. Ahonen P, Koskimies S, Lokki ML, Tiilikainen A, Perheentupa J. The expression of autoimmune polyglandular disease type I appears associated with several HLA-A antigens but not with HLA-DR. **J Clin Endocrinol Metab** 1988; 66: 1152-1157.
21. Arulanantham K, Dwyer JM, Genel M. Evidence for defective immunoregulation in the syndrome of familial candidiasis endocrinopathy. **N Engl J Med** 1979; 300: 164-168.
22. Aaltonen J, Björsees P, Sandkuijl L, Perheentupa J, Peltonen L. An autosomal locus causing autoimmune disease: autoimmune polyglandular disease type I assigned to chromosome 21. **Nat Genet** 1994; 8: 83-87.
23. Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, et al. Positional cloning of the APECED gene. **Nat Genet** 1997; 17: 393-398.
24. Betterle C, Volpato M, Greggio NA, Presotto F. Type 2 polyglandular autoimmune disease (Schmidt's syndrome). **J Pediatr Endocrinol Metab** 1996; 9: 113-123.
25. Meyerson J, Lechuga-Gomes EE, Bigazzi PE, Walfish PG. Polyglandular autoimmune syndrome: current concepts. **Can Med Assoc J** 1988; 138: 604-612.
26. Eisenbarth G, Wilson P, Ward F, Lebovitz HE. HLA type and occurrence of disease in familial polyglandular failure. **N Engl J Med** 1978; 298: 92-94.
27. Maclaren NK, Riley WJ. Inherited susceptibility to autoimmune Addison's disease is linked to human leucocyte antigens-DR3 and/or DR4, except when associated with type I autoimmune polyglandular syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 1986; 62: 455-459.
28. Weetman AP, Zhang L, Tandon N, Edwards OM. HLA associations with autoimmune Addison's disease. **Tissue Antigens** 1991; 38: 31-33.
29. Latinne D, Vanderput Y, De Bruyere M, Bottazzo GF, Sokal G, Crabbe J. Addison's disease: immunological aspects. **Tissue Antigens** 1987; 30: 23-24.
30. Weetman AP. Autoimmunity to steroid-producing cells and familial polyendocrine autoimmunity. **Baillière's Clin Endocrinol Metab** 1995; 9: 157-174.
31. Partanen J, Peterson P, Westman P, Aranko S, Krohn K. Major histocompatibility complex class II and III in Addison's disease. MHC alleles do not predict autoantibody specificity and 21-hydroxylase gene polymorphism has no independent role in disease susceptibility. **Hum Immunol** 1994; 41: 135-140.
32. Winqvist O, Söderbergh A, Kämpe O. The autoimmune basis of adrenocortical destruction in Addison's disease. **Mol Med Today** 1996; 2: 282-289.
33. Peterson P, Partanen J, Aavik E, Salmi H, Pelkonen R, Krohn KJE. Steroid 21-hydroxylase gene polymorphism in Addison's disease patients. **Tissue Antigens** 1995; 46: 63-67.
34. Donner H, Braun J, Seidl C, Rau H, Finke R, Venz M, et al. Codon 17 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene in Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. **J Clin Endocrinol Metab** 1997; 82: 4130-4132.
35. Brenner O. Addison's disease with atrophy of the cortex of suprarenals. **Q J Med** 1928; 22: 121-144.
36. Petri M, Nerup J. Addison's adrenalitis. Studies on diffuse lymphocytic adrenalitis (idiopathic Addison's disease) and focal lymphocytic infiltration in a control material. **Acta Pathol Microbiol Scand** 1971; 79: 381-388.
37. Hayashi Y, Hioshi T, Takemura T, Kurashima C, Hirokawa K. Focal lymphocytic infiltration in the adrenal cortex in the elderly: immunohistological analysis of infiltrating lymphocytes. **Clin Exp Immunol** 1989; 77: 101-105.
38. Jackson R, McNicol AM, Farquharson M, Foulis AK. Class II MHC expression in normal adrenal cortex and cortical cells in autoimmune Addison's disease. **J Pathol** 1988; 155: 113-120.
39. Moulton JS, Moulton JS. CT of the adrenal glands. **Semin Roentgenol** 1988; 23: 288-303.
40. Doppman JL, Gill JR, Nienhuis AW, Earl JM, Long JA. CT findings in Addison's disease. **J Comput Assist Tomography** 1982; 6: 757-761.
41. De la Veja MS, Artero CV, Mias EM, Real JMF, Ramón JS. Importancia de la tomografía axial computadorizada en el diagnóstico etiológico de la enfermedad de Addison. **Rev Clin Esp** 1992; 190: 177-180.
42. Vita JA, Silverberg SJ, Goland RS, Austin JHM, Knowlton AI. Clinical clues to the cause of Addison's disease. **Am J Med** 1985; 78: 461-466.
43. Calcinaro F, Lafferty KF, Shehadeh NN. Inflammatory mediators and development of autoimmune diabetes. In: Eisenbarth G, Lafferty KJ, editors. **Type I diabetes**. Cary: Oxford University Press, 1996: 91-118.
44. Papanicolou DA. Cytokines and adrenal insufficiency. **Curr Opin Endocrinol Diabetes** 1997; 4: 194-198.
45. Fairchild RS, Schimke RN, Abdou NI. Immunoregulation abnormalities in familial Addison's disease. **J Clin Endocrinol Metab** 1980; 51: 1074-1077.
46. Bendixen G, Soborg M. A leucocyte migration technique for *in vitro* detection of cellular (delayed type) hypersensitivity in man. **Dan Med Bull** 1969; 16: 1-6.
47. Weiser WY, Temple PA, Witek-Giannotti JS, Remold HG, Clark SC, David JR. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. **Proc Natl Acad Sci USA** 1989; 86: 7522-7526.
48. Nerup J, Andersen V, Bendixen G. Anti-adrenal cellular hypersensitivity in Addison's disease. **Clin Exp Immunol** 1969; 4: 355-363.
49. Nerup J, Bendixen G. Anti-adrenal cellular hypersensitivity in Addison's disease. II. Correlation with clinical and serological findings. **Clin Exp Immunol** 1969; 5: 341-353.
50. Freeman M, Weetman AP. T and B cell reactivity to adrenal antigens in autoimmune Addison's disease. **Clin Exp Immunol** 1992; 88: 275-279.
51. Rabinow SL, Jackson RA, Dluhy RG, Williams GH. Ia-positive T lymphocytes in recently diagnosed idiopathic Addison's disease. **Am J Med** 1984; 77: 597-601.
52. Fujii Y, Kato N, Kito J, Asai J, Yokochi T. Experimental autoimmune adrenalitis: a murine model for Addison's disease. **Autoimmunity** 1992; 12: 47-52.
53. Anderson JR, Goudie RB, Gray KG, Timbury GC. Auto-antibodies in Addison's disease. **Lancet** 1957; 1: 1123-1124.
54. Blizzard RM, Kyle MA, Chandler RW, Hung W. Adrenal antibodies in Addison's disease. **Lancet** 1962; 2: 901-903.

55. Irvine WJ, Stewart AG, Scarth L. A clinical and immunological study of adrenocortical insufficiency (Addison's disease). **Clin Exp Immunol** 1967; 2: 31-69.
56. Irvine WJ, Barnes EW. Adrenocortical insufficiency. **Clin Endocrinol Metab** 1972; 1: 549-594.
57. Wuepper KD, Wegienka LC, Fudenberg HH. Immunological aspects of adrenocortical insufficiency. **Am J Med** 1969; 46: 206-216.
58. Maisey MN, Lessof MH. Addison's disease: a clinical study. **Guy's Hosp Rep** 1969; 118: 363-372.
59. Nerup J. Addison's disease - serological studies. **Acta Endocrinol** 1974c; 76: 142-158.
60. Blizzard RM, Chee D, Davis W. The incidence of adrenal and other antibodies in the sera of patients with idiopathic adrenal insufficiency (Addison's disease). **Clin Exp Immunol** 1967; 2: 19-30.
61. Papadopoulos KI, Hallengren B. Polyglandular autoimmune syndrome type II in patients with idiopathic Addison's disease. **Acta Endocrinol** 1990; 122: 472-478.
62. Falorni A, Laureti S, Nikoshkov A, Picchio ML, Hallengren B, Vandewalles CL, et al. 21-hydroxylase autoantibodies in adult patients with endocrine autoimmune diseases are highly specific for Addison's disease. **Clin Exp Immunol** 1997; 107: 341-346.
63. Stechemesser E, Scherbaum WA, Grossmann T, Berg PA. An ELISA method for the detection of autoantibodies to adrenal cortex. **J Immunol Methods** 1985; 80: 67-76.
64. Kosowicz J, Gryczynska M, Bottazzo GF. A radioimmunoassay for the detection of adrenal autoantibodies. **Clin Exp Immunol** 1986; 63: 671-679.
65. Silva RS, Faiçal S, Laureti S, Falorni A, Dib SA, Kater CE. Detection of adrenocortical autoantibodies in Addison's disease with a peroxidase-labelled protein A technique. **Braz J Med Biol Res** 1998; 31: 1141-1148.
66. Anderson JR, Goudie RB, Gray K, Stuart-Smith DA. Immunological features of idiopathic Addison's disease: an antibody to cells producing steroid hormones. **Clin Exp Immunol** 1968; 3: 107-117.
67. Irvine WJ, Chan MMW, Scarth L. The further characterization of autoantibodies reactive with extra-adrenal steroid-producing cells in patients with adrenal disorders. **Clin Exp Immunol** 1969; 4: 489-503.
68. Irvine WJ, Chan MMW, Scarth L. Immunological aspects of premature ovarian failure associated with Addison's disease. **Lancet** 1968; ii: 883-887.
69. Elder M, Maclaren N, Riley W. Gonadal autoantibodies in patients with hypogonadism and/or Addison's disease. **J Clin Endocrinol Metab** 1981; 52: 1137-1142.
70. Betterle C, Rossi A, Dalla Pria S, Artifoni A, Pedini B, Gavasso S, et al. Premature ovarian failure: autoimmunity and natural history. **Clin Endocrinol (Oxf)** 1993; 39: 35-43.
71. Ahonen P, Miettinen A, Perheentupa J. Adrenal and steroidal cell antibodies in patients with autoimmune polyglandular disease type I and risk of adrenocortical and ovarian failure. **J Clin Endocrinol Metab** 1987; 64: 494-500.
72. Hoek A, Schoemaker J, Drexhage HA. Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. **End Rev** 1997; 18: 107-134.
73. Sotsiou F, Bottazzo GF, Doniach D. Immunofluorescence studies on autoantibodies to steroid-producing cells, and to germline cells in endocrine disease and infertility. **Clin Exp Immunol** 1980; 39: 97-111.
74. De Bellis A, Bizzarro A, Rossi R, Amoresano Paglionico V, Criscuolo T, Lombardi G, Bellastella A. Remission of subclinical adrenocortical failure in subjects with adrenal autoantibodies. **J Clin Endocrinol Metab** 1993; 76: 1002-1007.
75. Betterle C, Zanchetta R, Trevisan A, Zanette F, Pedini B, Mantero F. Complement-fixing adrenal autoantibodies as a marker for predicting onset of idiopathic Addison's disease. **Lancet** 1983; 1983; i: 1238-1241.
76. Scherbaum WA, Berg PA. Development of adrenocortical failure in non-addisonian patients with antibodies to adrenal cortex. **Clin Endocrinol** 1982; 16: 345-352.
77. Betterle C, Scalici C, Presotto F, Pedini B, Moro L, Rigon F, et al. The natural history of adrenal function in autoimmune patients with adrenal autoantibodies. **J Endocrinol** 1988; 117: 467-475.
78. Pousset G, Monier JC, Thivolet J. Anticorps antisurrénaux et maladie d'Addison. Application de la technique d'immunofluorescence dans 100 cas d'insuffisance surrénale. **Ann Endocrinol** 1970; 31: 995-1002.
79. Goudie RB, Anderson JR, Gray KK, Whyte G. Autoantibodies in Addison's disease. **Lancet** 1966; i: 1173-1176.
80. Goudie RB, McDonald E, Anderson JR, Gray K. Immunological features of idiopathic Addison's disease: characterization of the adrenocortical antigens. **Clin Exp Immunol** 1968; 3: 119-131.
81. Khoury EL, Hammond L, Bottazzo GF, Doniach D. Surface-reactive antibodies to human adrenal cells in Addison's disease. **Clin Exp Immunol** 1981; 45: 48-55.
82. Bright GM, Singh I. Adrenal autoantibodies bind to adrenal subcellular fractions enriched in cytochrome-c reductase and 5'-nucleotidase. **J Clin Endocrinol Metab** 1990; 70: 95-99.
83. Wulffraat NM, Drexhage HA, Bottazzo GF. Autoimmune aspects of Addison's disease. In: James VHT, editor. **The Adrenal Gland**. 2nd ed. New York: Raven Press, 1992: 263-288.
84. Furmaniak J, Talbot D, Reinwein D, Benker G, Creach FM, Rees Smith B. Immunoprecipitation of human adrenal microsomal antigen. **FEBS Lett** 1988; 231: 25-28.
85. Winqvist O, Andres Karlsson F, Kämpe O. 21-hydroxylase, a major autoantigen in idiopathic Addison's disease. **Lancet** 1992; 339: 1559-1562.
86. Baumann-Antczak A, Wedlock N, Bednarek J, Kiso Y, Krishnan H, Fowler S, et al. Autoimmune Addison's disease and 21-hydroxylase. **Lancet** 1992; 340: 429-430.
87. White PC, New MI, DuPont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. **Proc Natl Acad Sci USA** 1986; 83:5111-5115.
88. Simpson ER, Waterman MR. Regulation of expression of adrenocortical enzymes. In: James VHT, editor. **The Adrenal Gland**. 2nd ed. New York: Raven Press, 1992: 191-207.
89. Wedlock N, Asawa T, Baumann-Antczak A, Rees Smith B, Furmaniak J. Autoimmune Addison's disease. Analysis of autoantibody binding sites on human steroid 21-hydroxylase. **FEBS Lett** 1993; 332: 123-126.

90. Song YH, Connor EL, Muir A, She JX, Zorovich B, Derovanessian D, et al. Autoantibody epitope mapping of the 21-hydroxylase antigen in autoimmune Addison's disease. **J Clin Endocrinol Metab** 1994; 78: 1108-1112.
91. Asawa T, Wedlock N, Baumann-Antczak A, Rees Smith B, Furmaniak J. Naturally occurring mutations in human steroid 21-hydroxylase influence adrenal autoantibody binding. **J Clin Endocrinol Metab** 1994; 79: 372-376.
92. Tanaka H, Asawa T, Powell M, Chen S, Rees Smith B, Furmaniak J. Autoantibody binding to steroid 21-hydroxylase – effect of five mutations. **Autoimmunity** 1997; 26: 253-259.
93. Volpato M, Prentice L, Chen S, Betterle C, Rees Smith B, Furmaniak J. A study of the epitopes on steroid 21-hydroxylase recognized by autoantibodies in patients with or without Addison's disease. **Clin Exp Immunol** 1998; 111: 422-428.
94. Björk E, Velloso LA, Kämpe O, Karlsson FA. GAD autoantibodies in insulin-dependent diabetes mellitus, stiff-man syndrome and autoimmune polyendocrine syndrome type I recognize different epitopes. **Diabetes** 1994; 43: 161-165.
95. Krohn K, Uibo R, Aavik E, Peterson P, Savilahti K. Identification by molecular cloning of an autoantigen associated with Addison's disease as steroid 17 α -hydroxylase. **Lancet** 1992; 339: 770-773.
96. Peterson P, Krohn KJE. Mapping of B cell epitopes on steroid 17 α -hydroxylase, an autoantigen in autoimmune polyglandular syndrome type I. **Clin Exp Immunol** 1994; 98: 104-109.
97. Winqvist O, Gustafsson J, Rorsman F, Anders Karlsson F, Kämpe O. Two different cytochrome P450 enzymes are the adrenal antigens in autoimmune polyendocrine syndrome type I and Addison's disease. **J Clin Invest** 1993; 92: 2377-2385.
98. Uibo R, Aavik E, Peterson P, Perheentupa J, Aranko S, Pelkonen R, Krohn KJE. Autoantibodies to cytochrome P450 enzymes P450_{scc}, P450_{c17} and P450_{c21} in autoimmune polyglandular disease types I and II and in isolated Addison's disease. **J Clin Endocrinol Metab** 1994; 78: 323-328.
99. Chen S, Sawicka J, Betterle C, Powell M, Prentice L, Volpato M, Rees Smith B, Furmaniak J. Autoantibodies to steroidogenic enzymes in autoimmune polyglandular syndrome, Addison's disease, and premature ovarian failure. **J Clin Endocrinol Metab** 1996; 81: 1871-1876.
100. Picado-Leonard J, Miller W. Cloning and sequence of the human gene for P450_{c17} (steroid 17 α -hydroxylase/17,20 lyase): similarity with the gene for P450_{c21}. **DNA** 1987; 6: 439-448.
101. Peterson P, Uibo R, Peränen J, Krohn K. Immunoprecipitation of steroidogenic enzyme autoantigens with autoimmune polyglandular syndrome type I (APS I) sera; further evidence for independent humoral immunity to P450_{c17} and P450_{c21}. **Clin Exp Immunol** 1997; 107: 335-340.
102. Weetman AP. Autoantigens in Addison's disease and associated syndromes. **Clin Exp Immunol** 1997; 107: 227-229.
103. Arif S, Vallian S, Farzaneh F, Zanone MM, James SL, Pietropaolo M, et al. Identification of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase as a novel target of steroid cell autoantibodies: association of autoantibodies with endocrine autoimmune disease. **J Clin Endocrinol Metab** 1996; 81: 4439-4445.
104. Winqvist O, Gebre-Medhin G, Gustafsson J, Ritzen EM, Lundkvist Ö, Anders Karlsson F, Kämpe O. Identification of the main gonadal autoantigens in patients with adrenal insufficiency and associated ovarian failure. **J Clin Endocrinol Metab** 1995; 80: 1717-1723.
105. Uibo R, Perheentupa J, Ovod V, Krohn KJE. Characterization of adrenal autoantigens recognized by sera from patients with autoimmune polyglandular syndrome (APS) type I. **J Autoimmunity** 1994; 7: 399-411.
106. Colls J, Betterle C, Volpato M, Prentice L, Rees Smith B, Furmaniak J. Immunoprecipitation assay for autoantibodies to steroid 21-hydroxylase in autoimmune adrenal diseases. **Clin Chem** 1995; 41: 375-380.
107. Falorni A, Nikoshkov A, Laureti S, Grenbäck E, Hulding AL, Casucci G, et al. High diagnostic accuracy for idiopathic Addison's disease with a sensitive radiobinding assay for autoantibodies against recombinant human 21-hydroxylase. **J Clin Endocrinol Metab** 1995; 80: 2752-2755.
108. Tanaka H, Perez MS, Powell M, Sanders JF, Sawicka J, Chen S, et al. Steroid 21-hydroxylase autoantibodies: measurements with a new immunoprecipitation assay. **J Clin Endocrinol Metab** 1997; 82: 1440-1446.
109. Furmaniak J, Kominami S, Asawa T, Wedlock N, Colls J, Rees Smith B. Autoimmune Addison's disease – Evidence for a role of steroid 21-hydroxylase autoantibodies in adrenal insufficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1994; 79: 1517-1521.
110. Boscaro M, Betterle C, Sonino N, Volpato M, Paoletta A, Fallo F. Early adrenal hypofunction in patients with organ-specific autoantibodies and no clinical adrenal insufficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1994; 79: 452-455.
111. Boscaro M, Betterle C, Volpato M, Fallo F, Furmaniak J, Rees Smith B, et al. Hormonal responses during various phases of autoimmune adrenal failure: no evidence for 21-hydroxylase enzyme activity inhibition *in vivo*. **J Clin Endocrinol Metab** 1996; 81: 2801-2804.
112. Laureti S, De Bellis A, Muccitelli VI, Calcinaro F, Bizzarro A, Rossi R, et al. Levels of adrenocortical autoantibodies correlate with the degree of adrenal dysfunction in subjects with pre-clinical Addison's disease. **J Clin Endocrinol Metab** (in press).
113. Peterson P, Salmi H, Hyöty H, Miettinen A, Ilonen J, Reijonen H, et al. Steroid 21-hydroxylase autoantibodies in insulin-dependent diabetes mellitus. **Clin Immunol Immunopathol** 1997; 82: 37-42.
114. Betterle C, Volpato M, Rees Smith B, Furmaniak J, Chen S, Zanchetta R, et al. II. Adrenal cortex and steroid 21-hydroxylase autoantibodies in children with organ-specific autoimmune diseases: markers of high progression to clinical Addison's disease. **J Clin Endocrinol Metab** 1997; 82: 939-942.
115. Betterle C, Volpato M, Rees Smith B, Furmaniak J, Chen S, Greggio NA, et al. I. Adrenal cortex and steroid 12-hydroxylase autoantibodies in adult patients with organ-specific autoimmune diseases: markers of low progression to clinical Addison's disease. **J Clin Endocrinol Metab** 1997; 82: 932-938.

116. Kendall-Taylor P, Lambert A, Mitchell R, Robertson WR. Antibody that blocks stimulation of cortisol secretion by adrenocorticotrophic hormone in Addison's disease. **Br Med J** 1988; 1489-1491.
117. Wulffraat NM, Drexhage HA, Bottazzo GF, Wiersinga WM, Jeucken P, Van der Gaag R. Immunoglobulins of patients with idiopathic Addison's disease block the *in vitro* action of adrenocorticotropin. **J Clin Endocrinol Metab** 1989; 69: 231-2238.
118. Wardle CA, Weetamn AP, Mitchell R, Peers N, Robertson WR. Adrenocorticotropic hormone receptor-blocking immunoglobulins in serum from patients with

Addison's disease; a reexamination. **J Clin Endocrinol Metab** 1993; 77: 75-753.

Endereço para correspondência:

Regina do Carmo Silva
Disciplina de Endocrinologia
Universidade Federal de São Paulo.
Rua Botucatu, 740 – 2º andar
04034-970 São Paulo, SP.
FAX: (011) 570-6636.
e-mail: rcarmo@mandic.com.br.