

Margaret de Castro
Lucila Leico Elias

RESUMO

Neste artigo discutiremos as causas raras de pseudo-hermafroditismo feminino. Hiperplasia congênita adrenal é a causa mais comum da ambigüidade da genitalia externa no nascimento, em fetos 46,XX, devido principalmente à forma clássica de deficiência de 21-hidroxilase. São apresentadas aqui as deficiências de 11 β -hidroxilase e de 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase, além da resistência familiar aos glicocorticóides, caracterizada pela secreção aumentada de cortisol sem evidência clínica de hipercortisolismo, mas com manifestações de excesso de andrógenos e de mineralocorticóides, decorrente de mutações no gene do receptor do glucocorticóide. Também são discutidas a deficiência de aromatase placentária, caracterizada por masculinização do feto feminino, acompanhada de virilização materna durante a gestação, e deve ser considerada na ausência da hiperplasia adrenal fetal e de tumores maternos produtores de andrógenos e a deficiência da P450-oxidoreductase, além das causas maternas e de quadros dismórficos complexos que levam ao pseudo-hermafroditismo feminino. A investigação requer a análise do cariótipo, dosagens séricas iniciais de 17OH progesterona, 11 desoxicortisol, 17-pregnenolone e andrógenos para avaliar o diagnóstico das diferentes causas de hiperplasia adrenal congênita. Após este diagnóstico ser afastado, dados clínicos e laboratoriais devem ser coletados para afastar as causas ainda mais raras de pseudo-hermafroditismo feminino. (Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49/1:126-137)

Descritores: Pseudo-hermafroditismo feminino; 21-hidroxilase; 11 β -hidroxilase; 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase; Resistência familiar aos glicocorticóides; Aromatase; Oxidoreductase P450

ABSTRACT

Rare Forms of Female Pseudohermaphroditism: When to Investigate?

The congenital adrenal hyperplasia is the commonest cause of ambiguity of the external genitalia at birth, due to classic forms of 21-hydroxylase and 11 β -hydroxylase deficiencies. 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β HSD) is a rare disorder that affects both sexes and female patients may have ambiguous genitalia. Familial glucocorticoid resistance is characterized by increased cortisol secretion without clinical evidence of hypercortisolism, but with manifestations of androgen and mineralocorticoid excess, caused by glucocorticoid receptor gene mutation, and rarely can lead to female pseudohermaphroditism. Placental aromatase deficiency is a rare disease characterized by a masculinized female fetus and a virilized mother, which should be considered in the absence of fetal adrenal hyperplasia and maternal androgen-secreting tumours. Finally, mutations of P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with ambiguous genitalia. The investigation of abnormal sexual development requires an initial karyotype analysis and serum 17OH progesterone, 11 deoxycortisol, 17 pregnenolone, and androgen measurements to assess the diagnosis of different forms of congenital adrenal hyperplasia. (Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49/1:126-137)

Keywords: Female pseudohermaphroditism; 21-hydroxylase; 11 β -hydroxylase; 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase; Familial glucocorticoid resistance; Aromatase; P450 oxidoreductase

Divisão de Endocrinologia do
Departamento de Clínica Médica
(MC) e Departamento de
Fisiologia (LLE), Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto –
FMRP-USP, SP.

Recebido em 15/11/04
Aceito em 20/11/04

A SECREÇÃO INTRA-ÚTERO EXCESSIVA dos andrógenos adrenais produz virilização do feto feminino. O desenvolvimento da genitália em feminina ou masculina começa em torno da 6^a semana de gestação. A secreção de andrógenos adrenais começa aproximadamente nesse mesmo tempo e quando excessiva, no sexo feminino, produz efeitos nas estruturas genitais externas similares àquelas que ocorrem em fetos masculinos normais, isto é, o alargamento do tubérculo genital, levando a vários graus de clitoromegalia. As aberturas uretral e genital se movem anteriormente e podem se fundir ao seio urogenital. Dependendo da gravidade da virilização, o seio pode se abrir no períneo, na base do falo ou até mesmo no topo da glândula. Adicionalmente, as fendas labioescrotais se fundem parcialmente ou completamente; se a fusão for completa, a estrutura resultante é indistinguível da bolsa escrotal masculina, embora os testículos não estejam presentes. Em alguns casos, por ser difícil a identificação da genitália externa, podendo ser confundida com uma genitália masculina criptorquídica, meninas podem ser freqüentemente criadas, até a idade adulta, como meninos (1). Portanto, o primeiro dado que deve chamar a atenção do clínico para o diagnóstico de pseudo-hermafroditismo feminino (PHF) é a presença de genitália com qualquer grau de masculinização, porém sem testículos palpáveis.

Em contraste com a genitália externa, as gônadas e as estruturas genitais internas (trompas, útero e cérvix) provenientes dos ductos Müllarianos se desenvolvem normalmente em crianças do sexo feminino expostas ao excesso de andrógenos no período pré-natal, pois o fator de inibição dos ductos Müllarianos, que causa a involução destas estruturas no sexo masculino, não é produzido pelo ovário fetal. Assim, mesmo as crianças 46,XX expostas ao excesso de andrógenos no período pré-natal têm potencial reprodutivo intacto se suas anormalidades genitais externas forem corrigidas cirurgicamente e se a secreção excessiva de andrógenos for controlada. Por esta razão, é importante que meninas expostas ao excesso de andrógenos no período pré-natal sejam criadas desde a infância como meninas, mesmo que o grau de virilização da genitália externa seja grave (1).

As principais causas de PHF estão descritas na tabela 1. Neste capítulo, abordaremos com mais detalhes as formas raras de PHF e como e quando delas suspeitar (figura 1). As formas virilizantes de hiperplasia adrenal congênita (HAC) são as causas mais freqüentes de PHF. Três das cinco enzimas envolvidas na esteroidogênese adrenal, 3 β -hidroxisteróide desidrogenase, 21-hidroxilase e 11 β -hidroxilase,

devem ser investigadas como causas de PHF.

A HAC por deficiência da 21-hidroxilase (21OH) é a causa mais frequente de PHF. A deficiência da 21OH ocorre em 95% dos casos de HAC (3). A 21OH participa da síntese dos glicocorticóides e dos mineralocorticóides. A redução da atividade da 21OH com decorrente diminuição da síntese de cortisol resulta em estimulação crônica do córtex adrenal pelo ACTH com hiperplasia adrenal e superprodução dos precursores do cortisol (17OH-progesterona), que são desviados para a biossíntese dos andrógenos, a qual não necessita da atividade da 21OH, causando os sinais de virilização característicos em pacientes 46,XX com esta deficiência enzimática. Tradicionalmente é classificada em duas formas clínicas: forma clássica que inclui os subgrupos perdedora de sal e virilizante simples, e não clássica que inclui os subgrupos sintomática e assintomática (ou críptica). A forma virilizante simples caracteriza-se por graus variados de virilização pré-natal da genitália externa no sexo feminino e virilização pós-natal em ambos os sexos, com aumento do clitóris ou pênis, pubarca precoce e avanço da idade óssea com prejuízo na estatura final. A forma perdedora de sal, além da hiperprodução androgênica da forma anterior, apresenta deficiência mais grave na produção de aldosterona levando à desidratação com hiponatremia e hiperpotassemia nos primeiros dias de vida que, quando não tratada, ocorre choque e óbito. A forma de início tardio sintomática não apresenta virilização pré-natal e os sintomas iniciam-se em épocas variáveis, resultando em pubarca precoce, amenorréia primária ou secundária, hirsutismo, acne e infertilidade, portanto esta forma de HCA não resulta em ambigüidade genital ao nascimento (4).

Tabela 1. Causas de pseudo-hermafroditismo feminino.

Virilização de causa fetal

- Hiperplasia adrenal congênita
 - Deficiência de 21-hidroxilase
 - Deficiência de 11 β -hidroxilase
 - Deficiência de 3 β -hidroxisteróide desidrogenase
- Resistência a glicocorticóide
- Deficiência de aromatase
- Deficiência de P450 oxidoreductase

Virilização de causa materna

- Uso de drogas
 - Esteróides anabolizantes
 - Progestágenos
 - Danazol
- Tumor de ovário ou de adrenal
- Hiperplasia adrenal congênita virilizante materna não controlada

Síndromes dismórficas

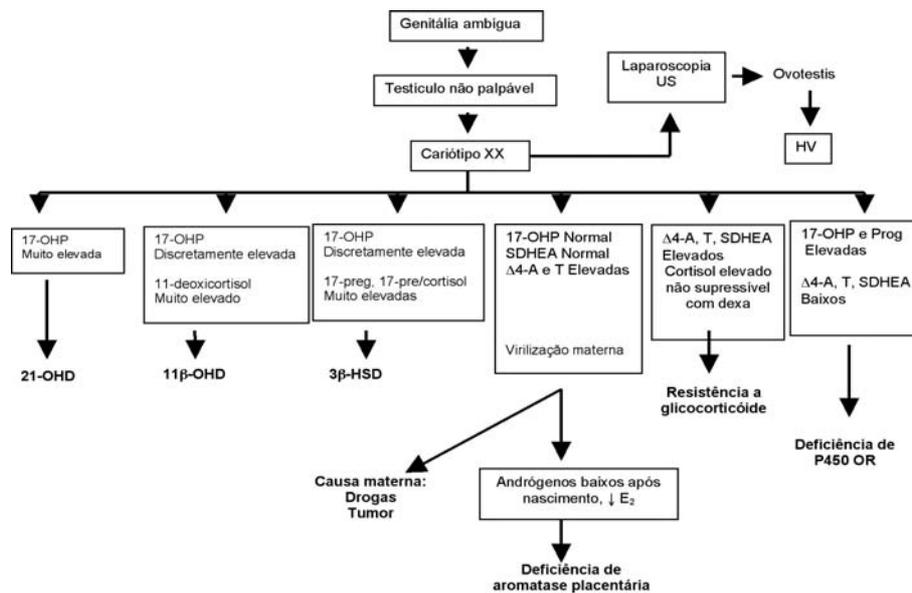


Figura 1. Fluxograma da investigação laboratorial de recém-nascido com genitália ambígua e gônada não palpável com cariótipo 46,XX.
US: ultra-som, 17-OHP: 17OH-progesterona, T: testosterona, SDHEA: sulfato de dehidroepiandrostenona, E2: estradiol, 21OHD: deficiência de 21-hidroxiase, 11OHD: deficiência de 11β-hidroxiase, 3βHSD: deficiência de 3β-hidroxiesteroide desidrogenase, P450-OR: P450-oxidoreduzase, HV: hermafroditismo verdadeiro.

A 21-hidroxiase é mediada por uma enzima citocromal específica denominada P450c21. O gene codificador da P450c21 está localizado no locus do complexo principal de histocompatibilidade humana no braço curto do cromossomo 6, 6p21, especificamente dentro do locus do HLA classe III (5). Existem dois genes para o P450c21, um pseudogene *CYP21P* e um gene ativo *CYP21*. Ambos contêm 10 exons, suas seqüências são 98% idênticas nos exons e 96% idênticas nos introns (2). O *CYP21P* é um pseudogene porque não codifica uma proteína devido à presença de várias mutações, sendo as mais comuns: deleção de 8 pares de bases no exon 3, inserção de T no exon 7 (as quais geram uma alteração na matriz de leitura), e uma substituição de C por T no exon 8 (que cria um “codon” prematuro de parada da leitura). O gene *CYP21* codifica uma proteína com 494 aminoácidos. A pesquisa dos grandes rearranjos e das 9 mutações de ponto mais freqüentes são responsáveis por 80 a 85% dos alelos na população brasileira (6-8). Os demais alelos devem apresentar mutações desconhecidas e requerem estudos de seqüenciamento do gene *CYP21* como relatadas nas diferentes populações, incluindo a brasileira (1,9,10). Neste artigo, a deficiência de 21OH não será discutida, pois sugeri-

mos para detalhes sobre diagnóstico clínico e molecular da deficiência de 21OH a leitura de recente publicação nos ABE&M (11).

HIPERPLASIA CONGÊNITA DE ADRENAL POR DEFICIÊNCIA DE 11β-HIDROXILASE

A deficiência da 11β-hidroxiase (11OH), na maioria dos países, corresponde a no máximo 5% dos casos de HCA, com freqüência em torno de 1:100.000 nascimentos (12,13). Na deficiência de 11OH, 11-desoxicortisol e deoxicorticosterona (DOC) não são convertidos eficientemente a cortisol e corticosterona, respectivamente. A diminuição da produção de glicocorticóides resulta em elevação da secreção de ACTH que estimula a zona fasciculada a produzir esteróides proximais ao bloqueio, além de estimular a superprodução de andrógenos pela zona reticular. O grau de virilização pode ser variável (Prader II a V) e o aspecto clínico da genitália de uma criança afetada por deficiência de 11OH pode ser completamente sobrepreonível aos encontrados na HCA por deficiência de 21OH.

A hipertensão arterial com alcalose hiperclêmica devido ao excesso de produção de DOC é uma das

características clínicas que distingue a deficiência de 11OH da deficiência da 21OH. Entretanto, a hipertensão arterial pode ou não estar presente (12,13) e é observada em 60% dos casos (14). A hipertensão, muitas vezes, só se manifesta nas fases mais tardias da infância ou adolescência e é atribuída ao excesso de DOC. Embora a hipertensão seja a principal característica da deficiência da 11OH, alguns pacientes, durante a infância, desenvolvem sinais de deficiência de mineralocorticóides, incluindo hipercalemia, hiponatremia e hipovolemia. Em alguns casos, esta crise de perda de sal pode ocorrer após a introdução da terapia com glicocorticóides, pois a função da zona glomerulosa pode estar cronicamente suprimida pela hipersecreção de desoxicorticosterona antes do tratamento, e um rápido decréscimo nos níveis de desoxicorticosterona pode não ser imediatamente compensado pelo aumento adequado na secreção de aldosterona (12). Entretanto, em alguns casos, a deficiência de mineralocorticóides tem-se apresentado antes do tratamento. O mecanismo pelo qual isto ocorre não está bem entendido, dado que a aldosterona é sintetizada pela enzima CYP11B2, que não está afetada na deficiência da 11OH (12).

A deficiência da 11OH denominada não clássica ou parcial também tem sido descrita. Esta é uma forma relativamente incomum. Entretanto, a sutileza com que esta variante se manifesta e as dificuldades associadas com o seu diagnóstico podem retardar sua identificação e resultar em uma redução significativa na estatura adulta se não tratada precocemente com reposição hormonal (15). As principais diferenças entre a deficiência da 11OH parcial e a forma clássica indicam que a incidência da deficiência da 11OH parcial é mais baixa; no sexo feminino, a virilização pré-natal ocorre em alguns casos de deficiência da 11OH parcial, já na forma clássica está sempre presente; hipertensão aparece em alguns casos de deficiência da 11OH parcial e está quase sempre presente na forma clássica. Pacientes com a forma não-clássica de deficiência de 11OH nascem com a genitália normal (algumas meninas afetadas apresentam clitoromegalia leve) e apresentam sinais e sintomas de excesso de andrógenos quando crianças. Mulheres adultas podem apresentar hirsutismo e oligomenorréia. Entretanto, a deficiência da 11OH é provavelmente responsável por menos de 1% dos casos de hirsutismo não selecionado e/ou oligomenorréia hiperandrogênica, usando como critério diagnóstico os níveis séricos elevados de 11-desoxicortisol depois de estimulação com ACTH. A frequência da deficiência da 11OH não-clássica na população geral não é conhecida (12).

A grande dificuldade diagnóstica encontra-se nos pacientes portadores da deficiência da 11OH forma clássica que são trazidos para a primeira consulta com idades variáveis, geralmente após dias ou meses do nascimento. O diagnóstico da deficiência de 11OH nem sempre é imediato e, em alguns casos, os pacientes são inicialmente tratados como deficiência de 21OH. Os pacientes com sexo genético 46, XX apresentam genitália ambígua desde o nascimento, em graus que variam desde clitoromegalia com fusão de rafe a micropênis com criptorquidia bilateral, enquanto os indivíduos 46,XY desenvolvem sinais de hiperandrogenismo após o nascimento. O dado clínico fundamental para o diagnóstico da deficiência de 11OH é a verificação da pressão arterial elevada, na maioria dos casos.

Na deficiência de 11OH, 11-desoxicortisol e deoxicorticosterona (DOC) não são convertidos eficientemente a cortisol e corticosterona, respectivamente. A diminuição da produção de glicocorticóides resulta em elevação da secreção de ACTH que estimula a zona fasciculada a produzir esteróides proximais ao bloqueio. Uma grande proporção destes esteróides é excretada na urina como tetrahydro metalólitos do 11-desoxicortisol. Portanto, o diagnóstico da forma clássica da deficiência da 11OH é feito pela constatação de níveis elevados, basais ou estimulados pelo ACTH, de três hormônios principais, 11-desoxicortisol e DOC séricos e tetrahydrodesoxicortisol metalólitos urinários. A atividade da renina plasmática é marcadamente suprimida devido à ação agonista de mineralocorticóides da DOC.

O diagnóstico pode ser complicado por diversos fatores e pode não ser realizado no período neonatal devido à ausência de hipertensão e a presença de atividade de renina supressa. Outra fonte de erro diagnóstico é a presença de discreta elevação dos níveis de 17OH-progesterona e como os níveis de 11-desoxicortisol e DOC não são freqüentemente mensurados, o diagnóstico errôneo de deficiência de 21OH é geralmente realizado (12,15). Os valores de cortisol basal, em geral, são baixos ou encontram-se dentro da faixa de valores normais, ao passo que os valores de ACTH apresentam-se muito acima da normalidade, assim como os dos compostos androgênicos plasmáticos como a testosterona e o sulfato de desidroepiandrosterona (11). Devemos ressaltar que o valor basal extremamente elevado de 11-desoxicortisol é fundamental para a definição do diagnóstico de deficiência de 11OH, tornando desnecessários os valores após teste com ACTH. É importante salientar que os valores para 17OH-progesterona basais estão aumentados, porém não nos níveis que caracterizam a forma

clássica de deficiência de 21OH. Muitas vezes a dosagem de 11-desoxicortisol não é realizada de imediato, porém a virilização ao nascimento, com valores elevados dos andrógenos plasmáticos, associado aos valores pouco aumentados de 17OH-progesterona, devem ser sugestivos da deficiência de 11OH. Nesse caso, a dosagem de 11-desoxicortisol é imprescindível e deve ser solicitada.

A enzima 11OH é uma das enzimas da família do citocromo P-450 chamada CYP11. Em humanos, há 2 isoenzimas, a CYP11B1 catalisa a conversão de 11-desoxicortisol a cortisol na camada fasciculada e a CYP11B2 age na conversão de desoxicorticosterona (DOC) a corticosterona, 18OH-corticosterona e aldosterona na camada glomerulosa (16). Mutações no gene *CYP11B1*, que codifica a enzima 11OH, causam HCA, ao passo que as mutações no gene *CYP11B2*, que codifica a enzima CYP11B2, são as causas da deficiência de corticosterona metiloxidase ou deficiência da aldosterona sintase (17). Por outro lado, a síndrome conhecida como hiperaldosteronismo supressível por glicocorticóides é resultado de uma recombinação intergênica, justapondo-se o promotor do *CYP11B1* com seqüências codificadoras do *CYP11B2* formando um gene híbrido (18,19). Mutações deletérias no gene *CYP11B1*, entretanto, são encontradas nas análises de DNA de pacientes com deficiência de 11OH e são correlacionadas com alterações em resíduos importantes para a atividade enzimática ou com interrupções da transcrição normal do gene gerando mRNA alterados e, conseqüentemente, proteínas truncadas (12,17,20-31). Para detalhes dos aspectos moleculares de cada uma das mutações no gene *CYP11B1* até hoje descritas ver referência 11.

HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA POR DEFICIÊNCIA DA ENZIMA 3 β -HIDROXI-ESTERÓIDE DESIDROGENASE TIPO 2

A hiperplasia adrenal congênita decorrente da deficiência da enzima 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β HSD) é uma doença autossômica recessiva rara, descrita em 1962 por Bongiovanni (32). O gene *3 β HSD* encontra-se no cromossomo 1p13.1 e possui 4 exons, 3 introns e uma região 5' flanqueadora (33). Os genes *3 β HSD* do tipo 1 (*HSD3B1*) e do tipo 2 (*HSD3B2*) são os responsáveis pela codificação das isoenzimas 3 β HSD do tipo 1 e do tipo 2, que possuem 93,5% de homologia (33). A enzima 3 β HSD1 é expressa nos tecidos periféricos, principalmente na pele, glândulas mamárias e na placenta e a 3 β HSD2 é

expressa na adrenal, nos testículos e ovário (34). A enzima 3 β HSD catalisa a conversão dos Δ^5 esteróides, tais como pregnenolona, 17OH-pregnenolona (17-Preg), deidroepiandrostenediona (DHEA) e androstenediol (Δ^5 -diol) em seus respectivos Δ^4 esteróides, a progesterona (P), 17OH-progesterona (17-OHP), androstenediona (Δ^4 -A) e testosterona (T) (34). Essa atividade enzimática é, portanto, de fundamental importância para a síntese de todas as classes de esteróides ativos (progesterona, mineralocorticóides, glicocorticóides, andrógenos e estrógenos). Em contraste com as alterações provocadas pela deficiência da 21OH e da 11OH, em que a síntese de esteróides está prejudicada apenas no córtex adrenal, a deficiência da 3 β HSD impede a síntese de esteróides tanto na adrenal como nas gônadas (35). Como a produção de andrógenos é diminuída, fetos do sexo masculino têm desenvolvimento incompleto da genitália externa com pseudo-hermafroditismo masculino, resultando em ambigüidade reconhecível ao nascimento. Recém-nascidos do sexo feminino, em geral, têm desenvolvimento normal da genitália externa ou apresentam sinais de virilização branda, como clitoromegalia, devido ao acúmulo de DHEA circulante e sua conversão, na periferia, para andrógenos mais potentes (35,36). Muitas vezes o diagnóstico neonatal é suspeito apenas pela presença de crise adrenal ou pela história clínica de irmãos afetados e, atualmente, no rastreamento neonatal para a deficiência de 21OH (concentrações elevadas de 17OH-progesterona).

Cerca de dois terços dos pacientes descritos com deficiência da 3 β HSD são 46,XY, pois os recém-nascidos do sexo feminino geralmente não apresentam alterações na genitália externa ao nascimento, dificultando o diagnóstico (36). Existem duas formas de HAC pela deficiência da 3 β HSD: uma forma clássica, reconhecida ao nascimento, que pode ou não apresentar perda de sal e uma forma não perdedora de sal, de desenvolvimento mais tardio (38-44), a qual se caracteriza pelo aparecimento de pubarca precoce em crianças e hirsutismo, acne, irregularidades menstruais em mulheres adultas.

O diagnóstico bioquímico da forma clássica da deficiência da 3 β HSD tem sido realizado com base nas concentrações elevadas dos esteróides Δ^5 como 17OH-pregnenolona e DHEA e seus metabólitos na urina e no sangue (40,41). No entanto, as concentrações dos esteróides Δ^4 também podem estar aumentadas, provavelmente devido à conversão dos esteróides Δ^5 em esteróides Δ^4 pela enzima 3 β HSD1 nos tecidos periféricos (38,40,43). A forma não perdedora de sal na criança 46,XX não é causa de ambigüi-

dade genital e é a situação clínica onde o diagnóstico hormonal apresenta dificuldades. Os critérios mais aceitos eram os critérios adotados por Pang e cols. (40,41) e baseavam-se em níveis de 17OH-pregnenolona, DHEA e relações 17OH-pregnenolona/17OH-progesterona e 17OH-pregnenolona/cortisol, basais e após estímulo com ACTH exógeno, maiores ou iguais a dois desvios-padrão da média comparados a controles com idade e estadiu puberal semelhantes. Entretanto, estudos de crianças com pubarca precoce e mulheres hirsutas, cujas dosagens hormonais se enquadravam nos critérios acima, não apresentavam alterações moleculares compatíveis com a doença, sugerindo que esse critérios não distinguiam pacientes com ou sem mutações no gene *HSD3B2*. Em 2002, Lutfallah e cols. (45) e, mais recentemente, nosso grupo (46) avaliaram os critérios bioquímicos e o estudo molecular em pacientes com apresentação clínica e/ou hormonal sugestiva de deficiência de 3β HSD. Os níveis basais e após estímulo com ACTH de 17OH-pregnenolona nos indivíduos comprovadamente portadores de mutação são muito mais elevados do que nos pacientes com genótipo normal. A relação 17OH-pregnenolona/cortisol após estímulo com ACTH exógeno esteve também claramente mais elevada nos pacientes com mutação do que nos pacientes sem mutação no gene *HSD3B2*. Estes estudos definitivamente descartam os critérios descritos inicialmente por Pang e cols. para o diagnóstico bioquímico da forma não perdedora de sal da deficiência da 3β HSD.

Mutações têm sido descritas no gene *HSD3B2* em pacientes com a forma perdedora e não perdedora de sal da deficiência da 3β HSD (34-36,38-45). Até hoje, não foi identificada nenhuma mutação no gene *HSD3B1* (44). Assim como ocorre na deficiência da 21OH, em que mutações diferentes resultam em uma grande heterogeneidade de manifestações clínicas, o mesmo tem sido observado na deficiência da 3β HSD (37,39). Geralmente, na forma clássica da 3β HSD com perda de sal, as mutações encontradas são mutações pontuais, em homozigose ou heterozigose composta, como *nonsense*, *frame-shift* ou *missense*, as quais abolem completamente a atividade da enzima 3β HSD. Na forma clássica sem perda de sal, geralmente, os pacientes estudados são homozigotos ou heterozigotos compostos para mutações *missense*, que mantêm até 10% da atividade enzimática quando esta é avaliada em estudos com células transfectadas em cultura (37). Como também se observa na 21OH, uma atividade enzimática mínima é suficiente para sintetizar aldosterona e evitar a perda de sal, e na maioria dos pacientes há correlação genótipo-fenótipo. Para detalhes dos

aspectos moleculares de cada uma das mutações no gene *HSD3B1* até hoje descritas ver referência 11.

SÍNDROME DE RESISTÊNCIA GENERALIZADA AOS GLICOCORTICÓIDES

A resistência aos glicocorticóides é uma doença hereditária rara (OMIM 38040), que resulta da incapacidade dos glicocorticóides exercerem seus efeitos nos tecidos-alvo, podendo ser familiar ou adquirida, generalizada ou tecido-específica. A resistência generalizada aos glicocorticóides (SRGG) de caráter familiar foi descrita inicialmente em 1976. É caracterizada pela hipossensibilidade de todos os tecidos do organismo ao cortisol, incluindo o hipotálamo e a hipófise (47). Nesta síndrome, assim como na doença de Cushing, o mecanismo de retro-alimentação negativo exercido pelos glicocorticóides encontra-se comprometido, resultando em elevadas concentrações plasmáticas de ACTH. A hipersecreção de ACTH, por sua vez, estimula o córtex adrenal a liberar quantidades excessivas de cortisol, na tentativa de compensar a resistência periférica. Concomitante ao aumento da secreção de cortisol, ocorre hipersecreção de mineralocorticóides e andrógenos, secundária ao estímulo do ACTH nas camadas glomerulosa e reticular.

Clinicamente, os pacientes apresentam-se sem os sinais da síndrome de Cushing, a despeito da presença de hipercortisolismo bioquímico. A apresentação clínica varia desde a ausência de sintomas ou queixas sutis de fadiga crônica até quadros clínicos mais exuberantes com hipertensão arterial e alcalose hipocalêmica e, caso predomine a hipersecreção de andrógenos, o quadro clínico pode apresentar-se, na mulher, com sinais de virilização (acne, hirsutismo, oligomenorréia, oligoanovulação e infertilidade), na criança com pubarca precoce e no homem podem ocorrer alterações da espermatogênese e infertilidade (39-51).

Os critérios diagnósticos são, portanto, produção aumentada de cortisol na ausência de sinais clínicos de síndrome de Cushing, ausência de supressão do cortisol após administração de dexametasona, manutenção do ritmo circadiano do eixo HHA e da sua capacidade de responder ao estresse. Os pacientes respondem muito bem ao tratamento com doses elevadas (1-3mg/dia) de dexametasona (49,52).

A base molecular da resistência generalizada familiar aos glicocorticóides está parcialmente elucidada (49,51-53). Diferentes anormalidades funcionais no receptor de glicocorticóides (GR) têm sido detectadas nos indivíduos com SRGG, incluindo dimi-

nuição da capacidade de ligação ao hormônio, diminuição do número de receptores, aumento da termolabilidade e diminuição da capacidade de ligação do GR ao DNA (48,55,56). Até o momento, 6 mutações no gene do GR foram descritas, dentre os 30 casos ou membros assintomáticos de 10 famílias com SRGG relatados. Todas estas mutações localizam-se nos exons 5 a 9 do gene do GR (57-62).

Mais recentemente, tivemos a oportunidade de estudar uma menina mulata nascida com genitália ambígua de um casamento cujos pais eram primos (62). Sua genitália caracterizava-se por clitoromegalia, fusão labioescrotal e presença de seio urogenital. A criança havia sido tratada como um caso de HCA forma virilizante simples secundária à deficiência de 21OH, com acetato de cortisona (20mg/m²/dia), desde os 5 anos de idade. Aos 9 anos de idade, a criança apresentava-se com desenvolvimento mamário, estágio puberal Tanner V e com idade óssea avançada. Apresentava-se, ainda, com hipertensão arterial e concentrações séricas de potássio muito baixas. Os dados laboratoriais da paciente demonstraram elevadas concentrações de ACTH, cortisol, androstenediona e testosterona, com discreta elevação de 11-desoxicortisol. Apresentava, ainda, concentração aumentada de 17OH-progesterona, porém não compatíveis com o diagnóstico da forma clássica de HCA por deficiência de 21OH. Mais importante ainda, as concentrações elevadas de cortisol não suprimiam (28µg/dL) após o teste com dexametasona (2mg/dia/5dias).

As elevadas concentrações de cortisol, tanto em condições basais quanto após dexametasona, a hipertensão arterial associada com grave hipocalcemia levantaram a hipótese diagnóstica de SRGG. A paciente foi tratada com espironolactona 100mg/dia, com controle da hipocalcemia, seguida pela associação de dexametasona 1mg/dia, cuja dose foi gradualmente aumentada até 6mg/dia até encontrar completa supressão das concentrações de cortisol e andrógenos. A análise do seqüenciamento do gene do GR nesta paciente identificou uma mutação de ponto com a substituição de um único nucleotídeo (T→C) na posição 1844 no exon 5, causando uma substituição não conservada de uma valina por uma alanina no codon 571 no domínio de ligação ao ligante do GRα em homozigose na paciente e em heterozigose nos seus pais e em uma irmã. Adicionalmente, devido à primeira hipótese diagnóstica de HCA por deficiência de 21OH, foi também estudado o número de cópias dos genes *CYP21* e *C4* e o gene *CYP21* foi totalmente seqüenciado para afastar possíveis mutações de ponto. Além da mutação V571A no gene do GR, uma grande conversão no

gene *CYP21*, em heterozigose, foi identificada na paciente e em seu pai. O estudo da capacidade de transativação do mutante GRαV571A revelou perda da capacidade de transativar o promotor MMTV, em cerca de 10-50 vezes quando comparada com o receptor normal. Adicionalmente, com o estudo de ligação hormonal, observamos que o número de sítios de ligação do GR era semelhante aos controles, porém com menor afinidade do receptor mutante pelo ligante.

Este é o primeiro caso de SRGG com uma apresentação clínica peculiar, o quadro de genitália ambígua desde o nascimento. Todas as mutações descritas até hoje na SRGG estão localizadas no domínio de ligação ao ligante do GR. É importante salientar que nos três casos, com mutações no gene do GR em homozigose, do sexo masculino, os indivíduos eram mais gravemente afetados. Adicionalmente, todas as mulheres afetadas, descritas anteriormente, eram em estado de heterozigose. Estas apresentavam genitália externa normal, discretos ou moderados sinais de hiperandrogenismo, sempre após a puberdade. Esta paciente era homozigota para esta nova mutação no gene do GR e apresentava o fenótipo mais grave já descrito, com virilização pré- e pós-natal, resultando no quadro de pseudo-hermafroditismo feminino, ao nascimento que evoluiu, posteriormente, com pubarca precoce.

Embora os estudos clínicos, bioquímicos e moleculares tenham elucidado alguns dos mecanismos envolvidos na resistência generalizada aos glicocorticóides, têm sido descritos casos onde os pacientes apresentam quadro clínico e laboratorial característicos de SRGG; entretanto, não foram encontradas anormalidades na seqüência codificadora e nas junções exon/intron do gene do GR (63). Nestas famílias, o defeito molecular poderia estar na região regulatória do gene ou em outras moléculas que interagem com o GR na ligação aos glicocorticóides como, por exemplo, a hsp 90, ou em eventos pós-receptor, na interação do GR com co-fatores ativadores ou repressores, ou com outros fatores nucleares.

DEFICIÊNCIA DE AROMATASE PLACENTÁRIA

A deficiência de aromatase placentária é uma doença autossômica recessiva causada por mutação do gene *CYP19*, localizado em 15q21.1, que codifica a enzima aromatase. Esta enzima é expressa em diversos tecidos, como a placenta, cérebro, ovário, testículo, tecido adiposo, fígado fetal, músculo, folículo piloso, osso, glândula hipofisária e sistema imune (64). Além do quadro

de PHF, a deficiência de aromatase resulta em virilização materna durante a gestação. O paciente com deficiência de aromatase desenvolverá na puberdade ovários policísticos, virilização com ausência de desenvolvimentos dos caracteres sexuais, alta estatura com atraso na maturação óssea e osteopenia (65). A deficiência de aromatase leva a uma menor conversão de andrógenos fetais e conseqüente masculinização da genitália externa no feto feminino, a partir do segundo trimestre. A ausência de desenvolvimento puberal e ovários multicísticos está associada à hiperestimulação dos ovários pelos altos níveis de LH e FSH e a incapacidade de aromatização de testosterona e androstenediona em estrógenos. O atraso na idade óssea confirma o papel preponderante dos estrógenos como esteróide sexual responsável pela maturação esquelética durante a puberdade (66).

No paciente do sexo masculino, a deficiência de aromatase não altera a diferenciação sexual ou a idade de início da puberdade, mas resulta, na vida adulta, em elevação de LH e FSH, não fechamento de cartilagem epifisária, osteoporose, macrorquidia e infertilidade (67).

O diagnóstico de deficiência de aromatase deve ser suspeitado em recém-nascidas com PHF em que a HAC foi afastada. As alterações hormonais ao nascimento caracterizam-se pelas altas concentrações de testosterona, androstenediona e gonadotrofinas. Um achado importante para a suspeita da deficiência de aromatase é a história clínica de virilização materna durante a gestação, com elevação das concentrações plasmáticas maternas de androstenediona, testosterona, SDHEA e dihidrotestosterona com baixas concentrações de estriol plasmático e urinário.

O tratamento com estrógenos resulta em desenvolvimento mamário, menarca, estirão do crescimento, supressão dos altos níveis de LH e FSH, bem como resolução dos cistos de ovário (66). No homem com deficiência de aromatase, a suplementação com estrógenos resulta em uma rápida maturação esquelética com fusão epifisária após 6 a 9 meses de tratamento e aumento da densidade mineral óssea (68).

As mutações do gene *CYP19* em pacientes com deficiência da aromatase estão localizadas em regiões críticas para atividade da enzima levando a uma atividade menor que 1% comparada à enzima intacta devido a uma menor estabilidade da enzima ou à menor ligação com o substrato (67). No primeiro estudo molecular da deficiência da aromatase observou-se uma mutação em ponto (GT→GC) no sítio 5' de *splicing* entre o exon 6 e intron 6 do gene *CYP19* (69). Esta mutação resultou em uma proteína anômala, cuja expressão em célula eucariótica evidenciou

atividade enzimática mínima. A deleção de citosina do códon 408 do gene *CYP19*, que codifica prolina, resulta em *frameshift* com códon de parada após 37 aminoácidos (Pro408X) e foi descrita em heterozigose composta com a mutação em ponto G→T no sítio de *splicing* entre o exon 3 e intron 3, com códon de parada após 3 pares de bases (70). O resíduo de cisteína 437 é importante para a atividade da aromatase, assim, a mutação Cys437Tyr resulta em uma proteína incapaz de incorporar o grupamento heme, eliminando toda atividade enzimática. Da mesma maneira, a carga positiva da arginina 435 é importante para o pareamento da *CYP19* com a carga negativa do grupamento heme, assim, a mutação Arg435Cys retém apenas 1% da atividade enzimática. A mutação Arg365Gln conserva menos de 1% de atividade, pois a arginina 365 é um resíduo altamente conservado e é importante para a manutenção da estabilidade da proteína. A mutação Arg375Cys pode também reduzir a ligação da aromatase com o seu substrato (67). O mesmo acontece com a mutação Val370Met, que provavelmente resulta em perda importante de função, levando a maior acúmulo de andrógenos, desde que a paciente portadora desta mutação, em homozigose, apresentou ambigüidade genital grau V de Prader (71). A deleção de citosina no exon 5 do gene *CYP19*, levando a um *frameshift* e uma proteína truncada com perda funcional foi descrita em um menino, cuja mãe apresentou virilização grave durante sua gestação (72). Existe correlação entre a atividade da aromatase da variante mutante e a masculinização do feto feminino e a virilização materna (70). A atividade residual da aromatase de 1% protege a mãe da virilização grave e está também associada à virilização menos grave da genitália externa do feto feminino (67).

DEFICIÊNCIA DE P450-OXIDOREDUCTASE

O citocromo P450-oxidoreductase (P450-OR) tem um papel essencial na esteroidogênese adrenal e gonadal, atuando como doador de elétrons nas reações catalisadas pelas enzimas microssomais *CYP17* e *CYP21*. Recentemente, Flück e cols. (73) relataram o quadro de deficiência da P450-OR em quatro pacientes com alteração na esteroidogênese associada ou não à síndrome de Antley-Bixler, caracterizada por craniosinostose, hipoplasia facial e sinostose radio-umeral (OMIM 207410) (73). O quadro clínico da deficiência da P450-OR caracteriza-se pela presença de genitália ambígua na criança do sexo feminino, indicando a exposição androgênica intra-uterina. No menino, ao

contrário, observa-se masculinização incompleta. A investigação bioquímica dos pacientes com quadro clínico da deficiência da P450-OR indicou, inicialmente, deficiência parcial de P450C17 e P450C21, contudo, o seqüenciamento dos genes *CYP17* e *CYP21* não evidenciou nenhuma alteração, motivando a investigação da P450-OR, doador de elétrons obrigatório destas enzimas. Flück e cols. (73) descreveram mutações no gene *P450-OR* em pacientes XX e XY com ambigüidade genital: mutação *missense* R475H em heterozigose composta com a mutação em ponto no sítio de *splicing* do íntron 6 (731+1G→A); mutações *missense* V492E em heterozigose e A287P em homozigose. Ainda neste estudo, em uma paciente brasileira com fenótipo normal ao nascimento e com desenvolvimento mamário normal, amenorréia primária e hipertensão arterial leve, os autores descreveram as mutações C569Y e C608F no gene *P450-OR* em heterozigose composta. A expressão das variantes mutantes contendo as trocas de aminoácidos demonstrou a redução da capacidade de oxidação do NADPH, bem como de redução do citocromo C (73). As variantes mutantes A287P, R475H, V492E, observadas em associação com a síndrome de Antley-Bixler, resultaram em redução da atividade tanto da 17 α -hidroxilase e 17,20 liase da P450C17, enquanto as variantes C569Y e C608F apresentaram atividade residual parcial. Assim, o fenótipo na deficiência de P450-OR parece correlacionar-se com o genótipo, com as mutações mais graves resultando em associação com as alterações esqueléticas observadas na síndrome de Antley-Bixler e as mutações mais leves com alterações apenas na esteroidogênese (73). Outros estudos têm demonstrado a deficiência de P450-OR, com novas mutações no gene *P450-OR*, como causa de ambigüidade genital tanto em pacientes 46,XX como em 46,XY (74,75).

CAUSAS MATERNAS

A exposição fetal a andrógenos de origem materna é pouco comum, mas a masculinização da genitália externa de fetos femininos foi observada após a ingestão materna, no primeiro trimestre de gestação, de progestágenos, testosterona e danazol, droga utilizada no tratamento de endometriose (65). Alterações na genitália do feto podem ocorrer mesmo na ausência de efeitos androgênicos na mãe, pois a dose necessária para masculinização da genitália externa fetal pode ser menor que a dose necessária para causar manifestações maternas.

A masculinização do feto feminino pode, também, ocorrer devido a um tumor materno virilizante de origem ovariana ou adrenal, ou ainda em decorrência de subtratamento da mãe portadora de hiperplasia adrenal congênita virilizante (65). Luteoma da gravidez, um pseudotumor ovariano constituído de células da teca hiperplasiadas, regride espontaneamente após a resolução da gestação, dificultando seu diagnóstico. Cistos ovarianos luteínicos na gravidez, considerados por alguns autores como uma forma cística de luteoma, são menos freqüentemente associados à virilização materna e, mais raramente, com masculinização fetal. Deve-se ressaltar que as causas maternas endógenas de PHF são pouco comuns, pois o hiperandrogenismo materno freqüentemente resulta em perda fetal.

SÍNDROMES DISMÓRFICAS

Alterações no desenvolvimento sexual podem estar associadas a síndromes de malformações do trato urinário e gastrointestinal e esqueléticas. Ao contrário das outras causas de PHF, nesta situação pode haver também alteração no desenvolvimento dos derivados Müllerianos. Os achados nesses casos incluem a presença de cloaca, ânus imperfurado, agenesia ou displasia renal. Entre algumas das síndromes genéticas associadas ao PHF podemos citar a síndrome de Seckel, com alterações da genitália no feto feminino, como clitoromegalia e hipoplasia de pequenos lábios (76). Na síndrome de McKusick-Kaufman há associação com hidrometrocolpo, agenesia de vagina com presença de seio urogenital no sexo feminino, e criptoquirdia e micropênis no sexo masculino (77). A atresia de vagina e malformações no desenvolvimento do ducto de Müller podem também ser observadas em várias outras síndromes (78).

REFERÊNCIAS

1. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **Endocr Rev** 2001;21:245-91.
2. White PC, New MI, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. **Proc Natl Acad Sci USA** 1986;83:5111-5.
3. Pang SY, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon IC, et al. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **Pediatrics** 1988;81:866-74.

4. Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New MI. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. **Am J Hum Genet** 1985; 37:650-67.
5. Carrol MC, Campbell RD, Porter RR. Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. **Proc Natl Acad Sci USA** 1985;82:521-5.
6. Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Marcondes JA, Longui CA, Leite MV, et al. Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83:4416-9.
7. Paulino LC, De Araujo M, Guerra Jr G, Marini SNVL, De Melo MP. Mutation distribution and CYP21/C4 locus variability in Brazilian families with the classical form of the 21-hydroxylase deficiency. **Acta Paediatr** 1999;88:275-83.
8. Torres N, Mello MP, Germano CM, Elias LL, Moreira AC, Castro M. Phenotype and genotype correlation of the microconversion from the CYP21A1P to the CYP21A2 gene in congenital adrenal hyperplasia. **Braz J Med Biol Res** 2003; 36:1311-8.
9. Billerbeck AE, Bachega TA, Frazatto ET, Nishi MY, Goldberg AC, Marin ML, et al. A novel missense mutation, GLY424SER, in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1999; 84:2870-2.
10. Lau IF, Soardi FC, Lemos-Marini SHV, Guerra Jr G, Baptista MTM, De Melo MP. H28+C insertion in the CYP21 gene: A novel frameshift mutation in a Brazilian patient with the classical form of 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86:5877-80.
11. de Mello MP, Bachega TASS, Costa-Santos M, Mermejo, LM, Castro M. Bases moleculares da hiperplasia adrenal congênita. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2002;46:457-77.
12. Zachmann M, Tassinari D, Prader A. Clinical and biochemical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. A study of 25 patients. **J Clin Endocrinol Metab** 1983;56:222-9.
13. White PC, Curnow KM, Pascoe L. Disorders of steroid 11 β -hydroxylase isozymes. **Endocr Rev** 1994; 15:421-38.
14. Al-Jurayyan N. Congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency in Saudi Arabia: clinical and biochemical characteristics. **Acta Paediatr** 1995;84:651-4.
15. Clark PA. Nonclassic 11 beta-hydroxylase deficiency: report of two patients and review. **J Pediatr Endocrinol Metab** 2000;13:105-9.
16. Kirita S, Morohashi K-I, Hashimoto T, Yoshioka H, Fujii-Kuriyama Y, Omura T. Expression of two kinds of cytochrome P-450(11 β) mRNA in bovine adrenal cortex. **J Biochem** 1988;104:683-6.
17. Curnow KM, Slutsker L, Vittek J, Cole T, Speiser PW, New MI, et al. Mutations in CYP11B1 causing Congenital Adrenal Hyperplasia and Hypertension Cluster in exons 6,7 and 8. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993;90:4552-6.
18. Pascoe L, Curnow KM, Slutsker L, Connell LMC, Speiser PW, New MI, et al. Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism results from hybrid genes created by unequal crossovers between CYP11B1 and CYP11B2. **Proc Natl Acad Sci USA** 1992;89:8327-31.
19. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Gutkin M, Fallo F, et al. Hereditary hypertension caused by chimaeric gene duplications and ectopic expression of aldosterone synthase. **Nature Genet** 1992;2:66-74.
20. Hampf M, Dao NT, Hoan NT, Bernhardt R. Unequal crossing-over between aldosterone synthase and 11 β -hydroxylase genes causes congenital adrenal hyperplasia. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86:4445-52.
21. Portrat S, Mulafero P, Curnow KM, Chaussain JL, Morel Y, Pascoe L. Deletion hybrid genes, due to unequal crossing over between CYP11B1 (11 β -hydroxylase) and CYP11B2 (aldosterone synthase) cause steroid 11 β -hydroxylase deficiency and congenital adrenal hyperplasia. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86:3197-201.
22. White PC, Dupont B, New MI, Leiberman E, Hochberg Z, Rösler A. A mutation in CYP11B1 (Arg-448 \rightarrow His) associated with steroid 11 β -hydroxylase deficiency in Jews of Moroccan origin. **J Clin Invest** 1991;87:1664-7.
23. Helmberg A, Ausserer B, Kofler R. Frame shift by insertion of 2 basepairs in codon 394 of CYP11B1 causes Congenital Adrenal Hyperplasia due to steroid 11 β -hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1992;75:1278-81.
24. Naiki Y, Kawamoto T, Mitsuuchi Y, Miyahara K, Toda K, Orii T, et al. A nonsense mutation (TGG (Trp116) \rightarrow TAG (stop)) in CYP11B1 causes steroid 11 β -hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1993;77:166-82.
25. Skinner CA, Rumsby G. Steroid 11 β -hydroxylase deficiency caused by a five base pair duplication in the CYP11B1 gene. **Hum Mol Genet** 1994;3:377-8.
26. Nakagawa Y, Yamada M, Ogawa H, Igarashi Y. Missense mutation in CYP11B1 (CGA(Arg-384) - GGA (Gly)) causes steroid 11 β -hydroxylase deficiency. **Eur J Endocrinol** 1995;132:286-9.
27. Geley S, Kapelari K, Johrer K, Peter M, Glatz J, Vierhapper H, et al. CYP11B1 mutations causing Congenital Adrenal Hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1996;81:2896-901.
28. Rosler A, Cohen H. Absence of steroid biosynthetic defects in heterozygote individuals for classic 11 beta-hydroxylase deficiency due to a R448H mutation in the CYP11B1 gene. **J Clin Endocrinol Metab** 1995;80:3771-3.
29. Rösler A, White PC. Mutations in human 11 β -hydroxylase genes: 11 β -hydroxylase deficiency in Jews of Morocco and corticosterone methyl-oxidase II deficiency in Jews of Iran. **J Steroid Biochem Molec Biol** 1993;45:99-106.
30. De Carvalho CE, Penachioni JY, Castro M, Moreira AC, De Mello MP. CYP11B1 intragenic polymorphisms give evidences for a different Q356X allele in an African-Brazilian patient. **J Endocr Genet** 1999;1:79-86.

31. Merke DP, Tajima T, Chhabra A, Barnes K, Mancilla E, Baron J, et al. Novel CYP11B1 mutations in congenital adrenal hyperplasia due to steroid 11 beta-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** **1998**;83:270-3.
32. Bongiovanni AM. The adrenogenital syndrome with deficiency of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. **J Clin Invest** **1962**;41:2086-92.
33. Luu The V, Lachance Y, Labrie C, Leblanc G, Thomas J, Strickler R, et al. Full-length cDNA structure and deduced amino acid sequence of human 3 β -hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase. **Mol Endocrinol** **1989**;3:1310-2.
34. Simard J, Durocher F, Mebarki F, Turgeon C, Sanchez R, Labrie Y, et al. Molecular biology and genetics of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 Δ^4 -isomerase gene family. **J Endocrinol** **1996**;150:S189-207.
35. Rhéaume E, Simard J, Morel Y, Mebarki F, Zachmann M, Forest MG, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to point mutations in the type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene. **Nat Genet** **1992**;1:239-45.
36. Moisan AM, Ricketts ML, Tardy V, Desrochers M, Mébaraki F, Chaussain JL, et al. New insight into the molecular basis of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency: identification of eight mutations in the HSD3B2 gene in eleven patients from seven new families and comparison of the functional properties of twenty-five mutant enzymes. **J Clin Endocrinol Metab** **1999**;84:4410-25.
37. Rosenfield RL, Rich BH, Wolfsdorf JI, Cassorla F, Parks JS, Bongiovanni AM, et al. Pubertal presentation of congenital Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. **J Clin Endocrinol Metab** **1980**;51:345-53.
38. Mendonça BB, Russel AJ, Vasconcelos-Leite M, Arnhold IJ, Bloise W, Wajchenberg BL, et al. Mutation in 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II associated with pseudohermaphroditism in males and premature pubarche or cryptic expression in females. **J Mol Endocrinol** **1994**;12:119-22.
39. Marui S, Castro M, Latronico AC, Elias LL, Arnhold IJ, Moreira AC, et al. Mutations in the type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD3B2) gene can cause premature pubarche in girls. **Clin Endocrinol** **2000**;52:67-75.
40. Pang S, Lerner AJ, Stoner E, Oberfield SE, Engel I, New MI. 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.
41. Pang S. Congenital adrenal hyperplasia owing to 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. **Endocrinol Metab Clin North Am** **2001**;30:81-99.
42. Simard J, Ricketts ML, Moisan AM, Tardy V, Peter M, Vliet GV, et al. A new insight into the molecular basis of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. **Endocr Res** **2000**;26:761-70.
43. Rhéaume E, Sanchez R, Simard J, Chang YT, Wang J, Pang S, et al. Molecular basis of congenital adrenal hyperplasia in two siblings with classical nonsalt 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** **1994**;79:1012-8.
44. Sanchez R, Rheau E, Laflamme N, Rosenfield RL, Labrie F, Simard J. Detection and functional characterization of the novel missense mutation Y254D in the type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β HSD) gene of a female patient with nonsalt-losing 3 β -HSD deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** **1994**;78:561-7.
45. Luffallah C, Wang W, Mason JI, Chang YT, Haider A, Rich B, et al. Newly proposed hormonal criteria via genotypic proof for type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** **2002**;87:2611-22.
46. Mermejo LM, Elias LL, Marui S, Moreira AC, Mendonça BB, Castro M. Refining hormonal diagnosis of type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency in patients with premature pubarche and hirsutism based on HSD3B2 genotyping. **J Clin Endocrinol Metab**; *in press*.
47. Vingerhoeds AC, Thijssen JH, Schwarz F. Spontaneous hypercortisolism without Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** **1976**;43:1128-33.
48. Chrousos GP, Vingerhoeds A, Brandon DD. Primary cortisol resistance in man: A glucocorticoid receptor-mediated disease. **J Clin Invest** **1982**;69:1261-9.
49. Chrousos GP, Detera WS, Karl M. Syndromes of glucocorticoid resistance. **Ann Intern Med** **1993**;119:1113-24.
50. Lamberts SW, Koper JW, Biemond P, Denholder FH, De Jong FH. Cortisol receptor resistance: the variability of its clinical presentation and response to treatment. **J Clin Endocrinol Metab** **1992**;74:313-21.
51. Zennaro MC. Syndromes of glucocorticoid and mineralocorticoid resistance. **Eur J Endocrinol** **1998**;139:127-38.
52. Charmandari E, Kino T, Souvatzoglou E, Vottero A, Bhat-tacharyya N, Chrousos GP. Natural glucocorticoid receptor mutants causing generalized glucocorticoid resistance: molecular genotype, genetic transmission, and clinical phenotype. **J Clin Endocrinol Metab** **2004**;89:1939-49.
53. Charmandari E, Kino T, Chrousos GP. Familial/sporadic glucocorticoid resistance: clinical phenotype and molecular mechanisms. **Ann NY Acad Sci** **2004**;1024:168-81.
54. Castro M, Chrousos GP. Glucocorticoid resistance. In: Bardin CW, editor. **Current therapy of endocrinology and metabolism**. Missouri: Mosby-Year Book Inc; **1997**.p.188-9.
55. Iida S, Gomi M, Moriwaki K, Itoh Y, Hirobe K, Matsuzawa Y. Primary cortisol resistance accompanied by a reduction in glucocorticoid receptors in two members of the same family. **J Clin Endocrinol Metab** **1985**;60:967-71.
56. Bronnegard M, Werner S, Gustafsson JA. Primary cortisol resistance associated with a thermolabile glucocorticoid receptor in a patient with fatigue as the only symptom. **J Clin Invest** **1989**;78:1270-8.
57. Hurley DM, Accili D, Stratakis CA, Karl M, Vamvakopoulos N, Rorer E, et al. Point mutation causing a single

- amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. **J Clin Invest** 1991;87:680-6.
58. Malchoff DM, Brufsky A, Reardon G, McDermott P, Javier EC, Bergh CH, et al. A mutation of the glucocorticoid receptor in primary cortisol resistance. **J Clin Invest** 1993;91:1918-25.
59. Karl M, Lamberts SW, Defera-Wadleigh SD, Encio IJ, Stratakis CA, Hurley DM, et al. Familial glucocorticoid resistance caused by a splice site deletion in the human glucocorticoid receptor gene. **J Clin Endocrinol Metab** 1993;76:683-9.
60. Karl MS, Lamberts SD, Koper JW. Cushing's disease preceded by generalized glucocorticoid resistance: clinical consequences of a novel, dominant-negative glucocorticoid-receptor mutation. **Proc Assoc Am Physicians** 1996;108:296-307.
61. Vottero A, Kino T, Combe H, Lecomte P, Chrousos GP. A novel, C-terminal dominant negative mutation of the GR causes familial glucocorticoid resistance through abnormal interactions with p160 steroid receptor coactivators. **J Clin Endocrinol Metab** 2002;87:2658-67.
62. Mendonça BB, Leite MV, De Castro M, Kino T, Elias LL, Bachega TA, et al. Female pseudohermaphroditism caused by a novel homozygous missense mutation of the GR gene. **J Clin Endocrinol Metab** 2002;87:1805-9.
63. Huizenga NATM, De Lange P, Koper JW, De Herder WW, Abs R, Kasteren JH, et al. Five patients with biochemical and/or clinical generalized glucocorticoid resistance without alterations in the glucocorticoid receptor gene. **J Clin Endocrinol Metab** 2000;85:2076-81.
64. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. **Endocr Rev** 1994;15:342-55.
65. Grumbach MM, Hughes IS, Conte FA. Disorders of sex differentiation. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed L, Polonsky KS, editors. **Williams textbook of endocrinology**. Philadelphia:Saunders; 2002.p.913-35.
66. Conte FA, Grumbach MM, Ito Y, Fisher CR, Simpson ER. A syndrome of female pseudohermaphroditism, hypergonadotropic hypogonadism, and multicystic ovaries associated with missense mutations in the gene encoding aromatase (P450arom). **J Clin Endocrinol Metab** 1994;78:1287-92.
67. Grumbach MM, Auchus RJ. Estrogen: consequences and implications of human mutations in synthesis and action. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84:4677-94.
68. Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, et al. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. **N Engl J Med** 1997;337:91-5.
69. Harada N, Ogawa H, Shozu M, Yamada K, Suhara K, Nishida E, et al. Biochemical and molecular genetic analyses on placental aromatase (P-450Arom) deficiency. **J Biol Chem** 1992;267:4781-5.
70. Mullis PE, Yoshimura N, Kuhlmann B, Lippuner K, Jaeger P, Harada H. Aromatase deficiency in a female who is compound heterozygote for two new point mutations in the P450arom gene: impact of estrogens on hypergonadotropic hypogonadism, multicystic ovaries, and bone densitometry in childhood. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82:1739-45.
71. Ludwig M, Beck A, Wickert L, Bolkenius U, Tittel B, Hinkel K, et al. Female pseudohermaphroditism associated with a novel homozygous G-to-A (V370-to-M) substitution in the P-450 aromatase gene. **J Pediatr Endocrinol Metab** 1998;11:657-64.
72. Deladoey J, Fluck C, Bex M, Yoshimura N, Harada N, Mullis PE. Aromatase deficiency caused by a novel P450arom gene mutation: impact of absent estrogen production on serum gonadotropin concentration in a boy. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84:4050-4.
73. Fluck CE, Tajima T, Pandey AV, Arlt W, Okuhara K, Verge CF, et al. Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley-Bixler syndrome. **Nat Genet** 2004;36:228-30.
74. Arlt W, Walker EA, Draper N, Ivison HE, Ride JP, Hammer F, et al. Congenital adrenal hyperplasia caused by mutant P450 oxidoreductase and human androgen synthesis: analytical study. **Lancet** 2004;363:2128-35.
75. Fukami M, Horikawa R, Nagai T, Tanaka T, Naiki Y, Sato N, et al. POR (P450 Oxidoreductase) mutations and Antley-Bixler syndrome with abnormal genitalia and/or impaired steroidogenesis: molecular and clinical studies in 10 patients. **J Clin Endocrinol Metab** 2004;in press.
76. Arnold SR, Spicer D, Kouseff B, Lacson A, Gilbert-Barness E. Seckel-like syndrome in three siblings. **Pediatr Dev Pathol** 1999;2:180-7.
77. Slavotinek AM, Biesecker LG. Phenotypic overlap of McKusick-Kaufman syndrome with bardet-biedl syndrome: a literature review. **Am J Med Genet** 2000;95:208-15.
78. Simpson JL. Genetics of the female reproductive ducts. **Am J Med Genet** 1999;89:224-39.

Endereço para correspondência:

Margaret de Castro
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP
14049-900 Ribeirão Preto, SP
E-mail: castrom@fmrp.usp.br