LUCIANE CARNEIRO DE CARVALHO

**Avaliação clínica, laboratorial, genética e ovariana de
pacientes 46,XX com deficiência da atividade do P450c17:
uma revisão**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Berenice
Bilharinho de Mendonça

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Carvalho, Luciane Carneiro

Avaliação clínica, laboratorial, genética e ovariana de pacientes 46,XX com deficiência da atividade do P450c17 : uma revisão / Luciane Carneiro Carvalho. - São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Berenice Bilharinho de Mendonça.

Descritores: 1.Amenorreia 2.Anormalidades congênitas 3.Corticosteroides 4.Hormônios do corpo lúteo 5.Esteroide 17-alfa-hidroxilase 6.Cistos ovarianos 7.Progesterona 8.Diagnóstico 9.Genótipo 10.Fenótipo 11.Fenótipo de síndrome de Antley-Bixler 12.Esteroide 17-alfa-hidroxilase/deficiência 13.Deficiência de 17,20-liase 14.Proteína humana CYP17A1

USP/FM/DBD-022/15

Este trabalho foi realizado no Serviço e Endocrinologia e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Apoio: CAPES: Bolsa de mestrado

*Dedico esta dissertação a Deus, que é o Senhor da minha vida, meu criador,
meu Pai eterno, meu guia, meu protetor, meu amigo, meu sustentador, do
qual vem todas as dádivas e para quem eu vivo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força, pela saúde, pela sabedoria concedida em cada momento e pela esperança de vida eterna em Jesus Cristo, que é o que me move neste mundo.

À minha querida mãe e amiga Maria Noeme, a quem amo, pelo apoio aos meus estudos desde criança, pelas orações, por me incentivar nas minhas decisões de seguir em frente na carreira profissional, e pelo carinho de sempre.

Ao meu pai Tiburtino (*in memoriam*), pelo tempo que viveu conosco, pelo sustento, pelo exemplo de fé e pela disposição para o trabalho.

Ao meu esposo e companheiro Sidney, a quem amo, que compartilhou de perto comigo todo o tempo dedicado ao mestrado, pela paciência, por entender a minha ausência e pelo incentivo, sempre me apoiando nas minhas decisões de progredir nos estudos, desde a época da Residência Médica, quando namorávamos.

Aos meus irmãos Christiane e Vinicius, e aos meus respectivos cunhados Fábio e Camila, por se alegrarem comigo nas minhas conquistas, por me apoiarem em oração, e por se preocuparem com o meu êxito, mesmo distantes. Agradeço à minha sobrinha Milena, pela sua alegria e doçura, tornando os momentos mais leves. Amo a todos.

À minha tia Ruth, por ter me acolhido em sua casa no tempo em que fiz o mestrado, sempre tão gentil e atenciosa. Obrigada pelas sopinhas quentinhas.

À minha tia Selma, que também me concedeu um importante apoio no tempo em que estive em São Paulo, sempre me assessorando quando precisei, dedicada e prestativa.

A toda minha família de uma forma geral, todos os tios e primos, sogra, cunhados, etc., que, de uma forma ou de outra, me apoiaram.

Agradeço, de uma forma especial, à minha orientadora, Dra. Berenice, por ter me recebido aqui na USP e me aceitado como aluna, “abrindo as portas” para que eu pudesse crescer profissionalmente e ter novos conhecimentos, pelas explicações, pelos ensinamentos tanto acadêmicos e intelectuais, como pessoais, por ser um exemplo de médica, pesquisadora e pessoa, da qual me orgulho.

Agradeço às médicas e professoras Dra. Elaine, Dra. Sorahia e Dra. Maria Helena, com as quais tive a oportunidade de conviver no ambulatório, agradeço pelos momentos de discussão profissional e por terem me proporcionado grande aprendizado, ensinando-me vários aspectos importantes sobre a investigação e tratamento das comorbidades dos pacientes. À doutoranda Rosana Barbosa, que também esteve comigo no ambulatório e me auxiliou bastante explicando sobre o prontuário eletrônico, as pastas dos pacientes e outros mecanismos de pesquisa.

À Aline Zamboni, bióloga, por me ensinar, com paciência, sobre o estudo molecular, explicar, desde a base, como proceder nas técnicas de pesquisa genética no laboratório, e me ajudar com a PCR (pesquisa em cadeia de polimerase) e sequenciamento dos genes.

À Dra. Regina, por ter me passado todo conhecimento prévio nas pesquisas com o gene CYP17 para que eu pudesse me embasar na minha pesquisa.

À Dra. Larissa, pelo auxílio em relação ao gene da POR, complementando o meu projeto.

Ao Dr. Vinicius, por me ajudar na parte estatística, com pronta disponibilidade.

À Marlene, psicóloga do setor, por prontamente esclarecer sobre os aspectos psicológicos das pacientes estudadas.

À Cris e à Cidinha, por me ajudarem na extração de DNA e em outras assessorias importantes. À Fran, pela conservação dos materiais do laboratório. À Mirian, pela presteza em explicar sobre diversos assuntos relacionados à pesquisa.

À Nilda, secretária do setor, por diversas vezes me ajudar na parte burocrática.

Ao Dr. José Alcione por me receber no ambulatório de ginecologia infanto-juvenil para acompanhar por um tempo; e ao Dr. Gustavo, também ginecologista, por orientações gerais sobre o tema da pesquisa.

Aos médicos colaboradores de outras Instituições que forneceram dados de pacientes para complementação da minha pesquisa, dentre eles: Dra. Margaret de Castro, Dra. Livia Mermejo, Fernanda Coeli-Lacchini (USP – Ribeirão Preto); Rosana Quezado, Virginia Ribeiro Teixeira (Universidade Federal do Ceará – Fortaleza); Fabrícia Torres Gonçalves (Universidade Federal de Uberlândia – Minas Gerais); Dr. Alexandre José Faria Carrilho (Universidade Estadual de Londrina – Paraná); Kenny Yelena Del Toro Camargo (Unidad Médica Villa Country, Barranquilla – Colômbia); Dra. Gabriela Paula Finkielstain, Dr. Ignacio Bergadá (Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires – Argentina); Giselle Fernandes Taboada (Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ).

À Dra Luciani e à bióloga Michele, pela companhia em um Congresso Internacional no Texas que fui apresentar um pôster. Ao Dr. Ivo, por instruções gerais, e a todos os colegas do LIM 42, professores, médicos, pós-graduandos, preceptores, residentes, que, direta ou indiretamente, me auxiliaram com sugestões, conselhos, críticas e discussões.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo auxílio financeiro por meio da Bolsa de estudo, e ao Serviço de Endocrinologia, pelo auxílio em Congressos.

À SLEP (Sociedade Latino Americana de Endocrinologia Pediátrica), pelo financiamento por meio do prêmio de auxílio viagem para o “9th Joint Meeting of Paediatric Endocrinology”, em Milão, para apresentação do trabalho.

*“Porque Dele, e por Ele, e para Ele são todas as coisas;
glória, pois, a Ele eternamente. Amém”.*
Romanos 11:36

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Deficiência da atividade do P450c17	3
1.2 O gene <i>CYP17A1</i>	3
1.3 O gene <i>POR</i>	5
1.4 O gene <i>CYB5</i>	6
1.4.1 Determinação das atividade de 17 α -hidroxilação ou 17,20 liase pelo P450c17	7
1.5 Quadro clínico e laboratorial	8
2 OBJETIVO	12
3 PACIENTES E MÉTODOS	14
3.1 Casuística	14
3.2 Casos da nossa coorte	14
3.2.1 Exames laboratoriais	14
3.2.2 Ultrassonografia pélvica ou endovaginal	14
3.2.3 Estudo molecular	15
3.2.3.1 Extração de DNA	15
3.2.3.2 PCR - <i>CYP17</i>	15
3.2.3.3 PCR – <i>POR</i>	15
3.2.3.4 Sequenciamento – <i>CYP17</i> e <i>POR</i>	16
3.2.3.5 Análise estatística	17
3.3 Casos da revisão da Literatura	17
4 RESULTADOS	20
4.1 Pacientes da coorte HCFMUSP	20
4.1.1 Pacientes com mutação no <i>CYP17A1</i>	20
4.1.1.1 Avaliação clínica	20

4.1.1.2 Avaliação Laboratorial pré e pós-tratamento	23
4.1.1.3 Avaliação ovariana.....	25
4.1.1.4 Análise molecular do gene <i>CYP17A1</i>	28
4.1.2 Caso clínico da paciente da coorte HCFMUSP com mutação no gene <i>POR</i>	30
4.1.3 Análise estatística dos valores laboratoriais das pacientes da coorte do HCFMUSP	31
4.2 Revisão da Literatura.....	33
4.2.1 Deficiência da atividade do P450c17 devido à mutação no gene <i>CYP17A1</i>	34
4.2.1.1 Avaliação Clínica.....	34
4.2.1.2 Avaliação Laboratorial.....	34
4.2.1.3 Avaliação Ovariana	36
4.2.1.4 Avaliação Molecular	36
4.2.2 Deficiência da atividade do P450c17 devido à mutação no gene da <i>POR</i>	37
4.2.2.1 Avaliação clínica	37
4.2.2.2 Avaliação laboratorial	38
4.2.2.3 Avaliação ovariana.....	39
4.2.2.4 Avaliação Molecular	39
5 DISCUSSÃO.....	41
5.1 Pacientes com mutações no <i>CYP17A1</i>.....	41
5.2 Pacientes com mutações no <i>POR</i>.....	44
6 CONCLUSÃO.....	49
6.1 Na deficiência da atividade do P450c17 devido à mutação no gene <i>CYP17A1</i> (n=23).....	49
6.2 Na deficiência da atividade do P450c17 por mutação no gene <i>POR</i> (n=9)	50
7 ANEXOS.....	53
7.1 ANEXO A - Família 1 – Pacientes 1, 2 e 3.....	53
7.2 ANEXO B - Família 2 – paciente 4.....	55
7.3 ANEXO C - Família 3 – paciente 5.....	57
7.4 ANEXO D - Família 4 – Pacientes 6 e 7.....	58
7.5 ANEXO E - Família 5 – paciente 8.....	59
7.6 ANEXO F - Família 6 – pacientes 9 e 10	61
7.7 ANEXO G - Família 7 – paciente 11.....	63

7.8 ANEXO H - Família 8 – Pacientes 12 e 13.....	65
7.9 ANEXO I - Família 9 - paciente 14	67
7.10 ANEXO J - Família 10 - pacientes 15 e 16	69
7.11 ANEXO K - Família 11 - paciente 17.....	71
7.12 ANEXO L - Família 12 – paciente 18	73
8 REFERÊNCIAS	75

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACO	Anticoncepcionais Orais
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
APR	Atividade Plasmática da Renina
CRH	Hormônio Hipotalâmico Liberador da Corticotrofina
<i>CYB5</i>	Citocromo B5
Dexa	Dexametasona
E2	Estradiol
hCG	Gonadotrofina Coriônica
nr	Não realizado
nv	Não visualizado
OD	Ovário Direito
OE	Ovário Esquerdo
<i>POR</i>	P450 Oxidorredutase
Pred	Prednisolona
SAB	Síndrome de Antley Bixler
VR	Valores de Referência

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da esteroidogênese suprarrenal mostrando os hormônios produzidos a partir dos respectivos substratos, além das enzimas e dos fatores responsáveis pela transformação hormonal.	2
Figura 2	Esquematização do <i>CYP17A1</i> com as mutações já descritas	4
Figura 3	Efeito da <i>POR</i> e B5 nas atividades do P450c17	5
Figura 4	O transporte de elétrons para P450c17	6
Figura 5	Esteroidogênese adrenocortical	9
Figura 6	Ilustração de paciente com a síndrome de Antley-Bixler mostrando presença de craniossinostose, clinodactilia nos pés e sinostose radioulnar	10
Figura 7	Ilustração da paciente HCFMUSP após a cirurgia para correção dos defeitos faciais	31
Figura 8	Correlação entre os níveis basais de FSH e o volume ovariano. Correlação de Pearson, $r: -0,47$; $p < 0,05$	32
Figura 9	Correlação entre os níveis basais de LH e o volume ovariano. Correlação de Pearson, $r = -0,31$, $p = 0,2$	32
Figura 10	Correlação entre os níveis da relação LH/FSH e o volume ovariano. Correlação de Pearson, $r: 0,35$; $p = 0,14$	33
Figura 11	Correlação entre os níveis basais de progesterona e o volume ovariano. Correlação de Pearson, $r: 0,32$; $p = 0,2$	33
Figura 12	Representação esquemática dos possíveis mecanismos responsáveis pela formação de grandes cistos ovarianos	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados clínicos de pacientes 46,XX com deficiência da atividade do P450c17 – coorte do HCFMUSP.....	21
Tabela 2	Dados laboratoriais pré-tratamento das pacientes 46,XX com deficiência da atividade do P450c17 da coorte do HCFMUSP	24
Tabela 3	Avaliação ovariana pré e pós-tratamento das pacientes 46,XX da coorte do HCFMUSP	26
Tabela 4	Alterações moleculares das pacientes 46,XX com deficiência da atividade do P450c17 na coorte do HCFMUSP	29
Tabela 5	Mediana e variação dos valores laboratoriais das pacientes 46,XX com mutação no <i>CYP17A1</i> ou no <i>POR</i> publicadas na literatura	35
Tabela 6	Mutações no <i>CYP17A1</i> e no <i>POR</i> em pacientes 46,XX já descritas na literatura.....	37

RESUMO

Carvalho LC. *Avaliação clínica, laboratorial, genética e ovariana de pacientes 46,XX com deficiência da atividade do P450c17: uma revisão* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2015.

A hiperplasia adrenal congênita (HAC) por deficiência no P450c17 é uma doença de herança autossômica recessiva raramente relatada em pacientes 46, XX. Nosso objetivo foi o de caracterizar o fenótipo e genótipo desta doença rara revendo os dados clínicos, laboratoriais, genéticos, e da função ovariana de pacientes 46,XX de uma coorte brasileira avaliada no HCFMUSP e dos casos já publicados na literatura. Foram avaliados retrospectivamente os dados de 18 pacientes brasileiras pertencentes a 12 famílias avaliadas no HCFMUSP, e revisados os dados de literatura de pacientes de 10 coortes com deficiência da atividade P450c17 (14 pacientes, 6 delas com defeitos no *CYP17A1* e 8 com defeitos no *POR*). Fenótipo: A maioria das pacientes apresentou-se com amenorreia primária (74 %) e 90 % das pacientes não desenvolveram pubarca; 69,5 % das pacientes apresentavam hipertensão arterial no momento do diagnóstico. Observamos uma alta incidência de distúrbios psiquiátricos (76%), como depressão, ansiedade e síndrome do pânico, em nossa coorte, mas não foram encontrados relatos na literatura. O ultrassom mostrou um aumento de pelo menos um dos ovários em 87 % dos pacientes antes do tratamento e macrocistos ovarianos em 65%, 6 pacientes (26%) referiram terem sido submetidas a cirurgia anterior para tratamento de torção ou ruptura de ovário. O tratamento com dexametasona, estrogênio e progesterona resultou em redução efetiva do volume ovariano. Todos os pacientes apresentaram níveis basais elevados de progesterona e LH e redução dos níveis de androgênios. Não observamos correlação entre os níveis de LH, da relação LH/FSH e de progesterona com o volume ovariano nos dois defeitos. Genótipo: O estudo molecular revelou que 17 pacientes de nossa coorte apresentavam mutações inativadoras no gene *CYP17A1* e 1 paciente no gene *POR*. Duas novas mutações foram identificadas no gene *CYP17A1*, a p.R362H no éxon 6 e a p.G478S no éxon 8. A mutação mais prevalente no *CYP17A1* foi a p.W406R identificada em 41 % das nossas famílias. Algumas das mutações no *CYP17A1* foram encontradas apenas na coorte brasileira, mas a mutação p.A287P encontrada no gene *POR* em uma das nossas pacientes é a mais prevalente na literatura. Em relação à etnia, houve um predomínio dos defeitos moleculares no *CYP17A1* em pacientes chinesas e brasileiras, enquanto que

os defeitos no gene POR foram mais relatados nas pacientes europeias e norte-americanas. Em conclusão, a análise retrospectiva do fenótipo, genótipo e morfologia ovariana de trinta e duas pacientes 46,XX portadoras de deficiência da atividade P450c17, nos permitiu destacar os seguintes aspectos: a importância da dosagem da progesterona basal para este diagnóstico, a alta prevalência de aumento dos ovários com a presença de macrocistos ovarianos com risco de torção, e de transtornos psiquiátricos identificados em nossa coorte. Acreditamos que esta revisão possa contribuir para o diagnóstico mais precoce desta rara doença congênita.

Descritores: Amenorreia; Proteína *CYP17A1*; Anormalidades congênitas; Deficiência de 17,20-liase; Cistos ovarianos; Corticosteroides; Progesterona; Esteróide 17-alfa-hidroxilase/deficiência; Citocromo P-450.

ABSTRACT

Carvalho LC. Clinical, ovarian, laboratory and genetic aspects of 46,XX patients with dysfunction of the P450c17 activity: a review [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2015.

Congenital adrenal hyperplasia due to P450c17 deficiency is rarely reported on 46,XX patients. Our aim was to characterize the phenotype and genotype of this rare disorder reviewing the clinical, laboratory, genetic and ovarian imaging of 46,XX patients of our cohort and of other already reported cases. We retrospectively reviewed 32 patients with deficiency of P450c17 activity: 18 Brazilian patients belonging to 12 families and 10 cohorts already published (fourteen 46,XX patients, 6 of them with *CYP17A1* defects and 8 with *POR* defects). Phenotype: most patients had primary amenorrhea (74%) and 90% of the patients did not develop pubarche; 69.5% of the patients had blood hypertension at diagnosis. We observed a high incidence of psychiatric disorders such as depression, anxiety and panic (76%) in our cohort but no reports were found in the literature. Ultrasound showed an increase of at least one of the ovaries in 87% of the patients before treatment and ovarian macrocysts in 65% of them; 6 patients (26%) had had previous surgery for twisting or ovarian rupture. Treatment with dexamethasone, estrogen and progesterone resulted in ovarian volume reduction. All patients showed elevated basal progesterone and LH and levels, and decreased androgen levels. There was no correlation between the levels of LH and progesterone and of LH/FSH ratio and the ovarian volume in both defects. Genotype: the molecular study showed that 17 patients from our cohort had inactivating mutation in the *CYP17A1* gene and 1 in *POR* gene. Two novel mutations were identified in the *CYP17A1* gene, the p.R362H in exon 6 and p.G478S in exon 8. The most prevalent mutation in the *CYP17A1* was the p.W406R, identified in 41% of our families. Some of the *CYP17A1* mutations were found only in the Brazilian cohort, but the mutation p.A287P found in the *POR* gene is the most prevalent in the literature. Regarding the ethnicity of the defects, there was a predominance of Chinese and Brazilian patients with defects in the *CYP17A1* whereas defects in *POR* were most reported in European and North-American subjects. Conclusion: In this data review of thirty-two 46,XX patients with dysfunction of P450c17 activity we characterized the phenotype and genotype of this rare disorder and emphasize: the importance of basal progesterone

measurement for this diagnosis, the high prevalence of ovarian macrocysts with risk of twisting, and the psychiatric disorders. We believe that this review may contribute to the early diagnosis of this disorder.

Descriptors: Amenorrhea; *CYP17A1* protein; Congenital abnormalities; 17,20-lyase deficiency; Ovarian cysts; Steroid; progesterone; Steroid 17-alpha-hydroxylase; Cytochrome P450.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As glândulas suprarrenais sintetizam, a partir do colesterol, três tipos de hormônios esteroides: os glicocorticoides, os mineralocorticoides e os hormônios sexuais. O cortisol, principal glicocorticoide produzido, inibe a produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e do hormônio hipotalâmico liberador da corticotrofina (CRH) por um mecanismo de retroalimentação.

A hiperplasia suprarrenal congênita é a denominação de um grupo de doenças de herança autossômica recessiva, caracterizadas pela deficiência de uma das enzimas que fazem parte da biossíntese do cortisol (Figura 1). Além da deficiência de cortisol, os diferentes tipos de hiperplasia podem, em virtude do excesso de ACTH, ter associado o aumento ou redução da produção de mineralocorticoides e esteroides sexuais¹.

Figura 1 - Representação esquemática da esteroidogênese suprarrenal mostrando os hormônios produzidos a partir dos respectivos substratos, além das enzimas e dos fatores responsáveis pela transformação hormonal.

A esteroidogênese também ocorre nas gônadas com a produção dos esteroides sexuais por meio do estímulo da gonadotrofina coriônica (hCG), e das gonadotrofinas hipofisárias, LH e FSH. É com a estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-ovários que ocorre a regulação do ciclo menstrual feminino. A ovulação ocorre após o pico do LH, que desencadeia o rompimento de um folículo ovariano que se desenvolveu.

1.1 Deficiência da atividade do P450c17

P450c17 é uma enzima do grupo do citocromo P450 microsomal, a qual é bifuncional, necessária para produção de glicocorticoides (atividade de 17 α -hidroxilase) e de esteroides sexuais (atividade de 17,20-liase)².

A deficiência combinada da atividade da 17 α -hidroxilase e da 17-20-liase foi descrita, pela primeira vez, por Biglieri *et al.*, em 1966³. Trata-se de uma doença autossômica recessiva muito rara, correspondendo a 1% de todos os casos de hiperplasia adrenal congênita, e é, geralmente, relatada na literatura por meio de casos isolados⁴. A produção hormonal da suprarrenal se dá por suas três camadas: glomerulosa, fasciculada e reticular. O ACTH estimula, fisiologicamente, as camadas fasciculada e reticular. A 17 α -hidroxilação não participa da via dos mineralocorticoides, assim, somente a produção de cortisol e de androgênios está prejudicada neste defeito enzimático^{5,6}.

O P450c17 é codificada por um gene denominado de *CYP17A1*⁷.

1.2 O gene *CYP17A1*

O *CYP17A1* humano tem 13 Kb, é constituído por oito éxons e sete íntrons abrangendo 8.673 pb, foi mapeado no cromossomo 10q24-q25 e é expresso nos tecidos suprarrenal, gonadal e no sistema nervoso central⁸. Este gene é responsável pela codificação de uma única enzima – o

citocromo P450c17, que catalisa a sequência de duas reações distintas: a 17 α -hidroxilação dos esteroides C21 e a clivagem do carbono C17, 20, convertendo os esteroides C21 a C19, exercendo as atividades de 17-hidroxilação e 17,20-liase, respectivamente, atuando, portanto, na produção de glicocorticoides (atividade da 17 α -hidroxilase) e na produção de esteroides sexuais (atividade da 17,20-liase)^{2,9}. A primeira descrição do gene *CYP17A1* foi feita por Picado-Leonard e Miller em 1987¹⁰.

Até o momento, já foram descritas cerca de 100 mutações no *CYP17*, entre elas, as mutações p.W406R, p.R362D, p.P428L e p.Y329D detectadas em famílias brasileiras^{4-6,11-17} (Figura 2).

Figura 2 - Esquematização do *CYP17A1* com as mutações já descritas. Em azul, estão as mutações já descritas em pacientes brasileiros, sublinhadas estão as mutações que afetam, principalmente, a atividade de 17,20 liase.

A atividade 17,20-liase depende da atividade das proteínas acessórias: P450 oxidoredutase (*POR*) e citocromo B5, enquanto a atividade da 17 α -hidroxilase depende apenas da *POR* (Figura 3). Os efeitos da *POR* e do B5 nas atividades do P450c17 foram bem analisados em estudo prévio e comprovou-se que a atuação do citocromo b5 é apenas na atividade da 17,20-liase¹⁸.

Figura 3 - Efeito da *POR* e B5 nas atividades do P450c17. Na figura A observa-se que utilizando-se como substrato a Pregnenolona, houve produção de 17 α -hydroxypregnenolona somente através da presença da *POR* (OR=oxirredutase), independente da adição de B5. Na figura B, utilizando-se como substrato a 17 α -hydroxypregnenolona, houve produção de Deidroepiandrosterona através da adição tanto da *POR*, quanto do B5, comprovando a importante participação do B5 nessa etapa. Na figura C, utilizando-se como substrato a Progesterona, houve produção de 17 α -hydroxyprogesterona somente através da presença da *POR* (OR=oxirredutase), independente da adição de B5. Na figura D, utilizando-se como substrato a 17 α -hydroxyprogesterona, houve produção efetiva de Androstenediona através da participação conjunta, tanto da *POR*, quanto do B5, comprovando a importante participação do B5 nessa etapa também^{18,19}.

1.3 O gene *POR*

A *POR* é uma oxidorredutase tipo flavoproteína, composta por 78 KDa e 680 aminoácidos que transfere elétrons do NADPH para as enzimas do citocromo P450 microsomal, incluindo as da via esteroidogênica P450c17 (17 α -hidroxilase/17,20 liase, codificadas pelo *CYP17A1*), P450c21 (21-hidroxilase, codificada pelo *CYP21A2*) e P450 aro (aromatase, codificada pelo *CYP19A1*), além da P450c51 (codificada pelo *CYP51A1* – atua na síntese de colesterol); e participa da metabolização hepática de drogas pelas enzimas do grupo citocromo P450²⁰. O gene humano da *POR* está localizado no cromossomo 7, possui 15 éxons, e é altamente polimórfico, já tendo sido descritas, aproximadamente, 50 mutações²¹.

1.4 O gene *CYB5*

O citocromo B5 (*CYB5*) é uma proteína que recebe elétrons da *POR*, e participa da transferência de elétrons para algumas reações do citocromo P450, incluindo a estimulação da atividade da 17,20-liase do P450c17 em humanos, e não da 17 α -hidroxilase^{22,23}. Tem sido demonstrado que o B5 não é um efetivo doador de elétrons, mas que atua como um fator alostérico que promove a interação da *POR* com o P450c17, aumentando a atividade da 17,20-liase, sem influenciar a atividade da 17 α -hidroxilase²². O gene humano do *CYB5* está localizado no braço longo do cromossomo 18 na posição 22.3, e possui 6 éxons. O principal papel fisiológico do *CYB5* é reduzir a meta-hemoglobina (hemoglobina férrica) à hemoglobina normal (HB ferrosa), ligada ao oxigênio, portanto, indivíduos com deficiência no *CYB5* também apresentam acúmulo de meta-hemoglobina^{22,24}. O *CYP17A1*, a *POR* e o *CYB5* também participam da produção estrogênica ovariana, estimulada pelas gonadotrofinas (Figura 4).

Figura 4 - O transporte de elétrons para P450c17.

A *POR*, ligada ao retículo endoplasmático, recebe um par de elétrons a partir de *NADPH* e transfere-os para a *FAD* (flavina-adenina-dinucleotídeo). O recebimento dos elétrons provoca uma mudança conformacional no *POR*, permitindo que os anéis isoaloxazina da *FAD* e *FMN* (radical flavina-mononucleotídeo) venham juntos para que os elétrons passem do *FAD* para a *FMN*. O *POR*, em seguida, retorna para a sua orientação original, permitindo que o domínio de *FMN* interaja com o local de ligação ao

parceiro redox do P450c17. Os elétrons, em seguida, viajam através da proteína P450c17 para chegar ao grupo heme e mediar a catálise. A interação de POR com P450c17 é coordenada por resíduos ácidos carregados negativamente sobre a superfície doadora de elétrons do domínio de FMN carregado positivamente e resíduos básicos no sítio de ligação de parceiros redox da parte côncava da P450c17. A interação do P450c17 e POR é facilitada pela ação alostérica do citocromo b5, e pela fosforilação de serina da P450c17^{1,22,24}.

A deficiência do P450c17 (formas completa e parcial), portanto, pode ser decorrente de mutações no próprio *CYP17A1* ou no gene *POR*. Também pode ser devida à alteração da ação isolada da 17,20-liase em razão da mutação no *CYP17A1* no local de ligação ao citocromo b5 e da mutação no próprio *CYP5*^{1,22,25}.

1.4.1 Determinação das atividade de 17 α -hidroxilação ou 17,20 liase pelo P450c17

Três fatores regem a transferência de elétrons a partir POR para P450c17, regulando a ação de 17,20 liase e de 17 α -hidroxilase. Em primeiro lugar, a atividade da 17,20-liase é favorecida por altas proporções molares de POR para o P450c17²⁶. Em segundo lugar, como dito, o citocromo b5 atua como um fator alostérico (em vez de um doador de elétrons) e promove a interação do POR com o P450c17, favorecendo a reação 17,20 liase²⁵. Terceiro, a atividade 17,20 liase é facilitada pela fosforilação de serina e/ou treonina no P450c17 por uma proteína quinase dependente de AMPc. Assim, a disponibilidade de elétrons determina se P450c17 realiza apenas 17 α -hidroxilação ou se também executa 17,20 liase. Os dados estruturais para POR em modelos animais e modelagem computacional da POR de humanos mostram que tanto o doador de elétrons quanto a superfície do domínio de FMN da POR são caracterizados por resíduos ácidos. Em contraste, a modelagem computacional de P450c17 humana que mostra o seu local de ligação ao parceiro redox, que recebe os elétrons do POR, é caracterizado por resíduos básicos de modo que P450c17 e POR interagem por interações eletrostáticas. A concorrência entre P450c17 e P450c21 para 17OHP disponível não é importante para determinar se 17OHP sofrerá 21-

hidroxilação ou 17,20 liase porque o P450c17 humano catalisa mal a conversão de 17OHP a androstenediona. Assim, a regulamentação da atividade de 17,20 liase e, conseqüentemente, da produção de andrógenos, depende dos seguintes fatores que facilitam o fluxo de elétrons para P450c17: altas concentrações de POR, a presença de citocromo b5, e serina fosforilação de P450c17^{1,22,25}.

1.5 Quadro clínico e laboratorial

O diagnóstico da deficiência da 17 α -hidroxilase/17,20-liase, em geral, é realizado na época da puberdade, quando os pacientes apresentam quadro de hipogonadismo hipergonadotrófico, geralmente associado à hipertensão arterial, hipocalcemia e níveis séricos reduzidos de cortisol. A via não 17-hidroxilada da zona fasciculada encontra-se enormemente ativada pelo ACTH, produzindo quantidades elevadas de deoxicorticosterona, corticosterona, e 18OH-deoxicorticosterona, responsáveis pela retenção hidrossalina, hipertensão arterial, hipocalcemia e supressão da atividade plasmática da renina, o que, conseqüentemente, irá suprimir a formação de aldosterona na zona glomerulosa. Além disso, a produção abundante de corticosterona fornece atividade glicocorticoide suficiente para compensar o estado de hipocortisolismo crônico⁴ (Figura 5).

Figura 5 - Esteroidogênese adrenocortical – a zona fasciculada tem duas vias de síntese: a “17 α -hidroxilada”, levando à produção de cortisol e a “não-17 α -hidroxilada”, responsável pela formação de corticosterona e 18OHDOC²⁷

Nas pacientes 46,XX, há quadro de amenorreia primária com hipodesenvolvimento ou ausência dos caracteres sexuais secundários.

Na deficiência isolada da 17,20-liase e do citocromo B5, o quadro clínico caracteriza-se por ausência de hipertensão arterial, com produção normal de cortisol, além da ausência de produção de androgênios tanto de origem da suprarrenal quanto de origem gonadal²⁵.

Na deficiência da *POR*, o quadro clínico é variável dependendo de qual parte da biossíntese esteroidogênica a atuação da *POR* está mais prejudicada. Os achados laboratoriais podem ser semelhantes aos da deficiência combinada da 17 α -hidroxilase/17,20-liase ou da 17,20-liase isolada. A maioria dos pacientes com deficiência da *POR* descrita até o momento também tem o fenótipo da síndrome de Antley-Bixler (ABS), caracterizada por craniossinostose, sinostose radioulnar ou radioumeral, fêmur curvo e outras alterações esqueléticas variáveis^{28,29} (Figura 6).

Figura 6 - Ilustração de paciente com a síndrome de Antley-Bixler mostrando presença de craniossinostose, clinodactilia nos pés e sinostose radioulnar³⁰

Na literatura, há relatos de pacientes 46,XX com alteração na atividade do P450c17 que apresentam ovários macrocísticos, e até queixa clínica inicial de torção de ovários, seja por alteração do *CYP17A1*, *POR* ou *CYB5*. Em alguns casos, pode ocorrer até a rotura dos cistos. Alguns autores sugerem que o aparecimento dos cistos possa ser devido ao aumento constante das gonadotrofinas, pela produção prejudicada dos esteroides^{16,31}.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Nosso objetivo foi avaliar retrospectivamente as pacientes 46,XX com deficiência da atividade do P450c17 atendidas em nossa instituição ou relatadas na literatura, nos seguintes aspectos:

1. Clínicos: Idade ao diagnóstico, consanguinidade, presença de amenorreia primária ou secundária, peso, altura, índice de massa corporal, presença de hipertensão arterial, idade óssea, aspectos psicológicos e comorbidades associadas.
2. Laboratoriais: avaliar o nível sérico dos hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal e gonadal relacionados com a deficiência da 17 α -hidroxilase/17,20-liase e da *POR* (LH, FSH, Estradiol, Progesterona, ACTH, Cortisol, 17OH-progesterona, testosterona, DHEAS, androstenediona, atividade plasmática da renina e aldosterona) e dos íons sódio e potássio, antes e após o tratamento.
3. Ovarianos: avaliar o tamanho e a presença de cistos antes e após o tratamento.
4. Genéticos: realizar a pesquisa de mutações nos genes *CYP17A1* e *POR* nas pacientes da nossa coorte.
5. Realizar uma análise dos dados acima e correlacioná-los entre si, objetivando caracterizar consistentemente o fenótipo desta rara doença com base nos casos por nós estudados associados aos casos já descritos na literatura.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Casuística

Consistiu em pacientes da nossa Instituição e de pacientes já descritos na literatura, com alteração do P450c17 ou na *POR*.

3.2 Casos da nossa coorte

Avaliamos 12 famílias, totalizando 18 pacientes, todas 46,XX, sendo 17 com deficiência da 17 α -hidroxilase/17,20-liase e 1 com alteração da *POR*, investigadas no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todas as pacientes deram seu consentimento para o estudo e assinaram o Termo de Consentimento para autorização da análise genética.

3.2.1 Exames laboratoriais

Os exames hormonais foram dosados por diferentes métodos, tais como radioimunoensaio, imunofluorimétrico e quimioiluminescência, e as dosagens de sódio e potássio por método eletrodo íon-seletivo.

3.2.2 Ultrassonografia pélvica ou endovaginal

O aspecto ovariano foi avaliado por meio da ultrassonografia. Foram utilizados transdutores pélvicos/abdominais (convexos) com frequências de onda variando de 2,0 a 5,0 mega-hertz e transdutores transvaginais (convexos endocavitários) variando de 5,0 a 10 mega-hertz. O volume

ovariano foi obtido pelo cálculo do diâmetro de uma elipse ($D1 \times D2 \times D3 \times 0,523$), e o volume uterino pela fórmula ($D1 \times D2 \times D3 \times 0,45$); o cálculo do tamanho dos cistos foi obtido pelo maior diâmetro ou pela área do cisto.

3.2.3 Estudo molecular

3.2.3.1 Extração de DNA

Amostras de DNA genômico das pacientes foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico utilizando o método de precipitação de sal, técnica de digestão com proteinase-K com sal (*salting out*)³². A concentração do DNA foi obtida por meio de leitura em espectrofotômetro (Amersham, Pharmacia, Uppsala, Suécia) no comprimento de onda 260 nm (1,0 unidade DO 260 = 50 µg/mL). Foi utilizada a razão 260/280 >1,8 como ideal de pureza do DNA. As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% para verificar sua integridade e estocadas a 4°C até a sua utilização.

3.2.3.2 PCR - *CYP17*

A região codificadora do *CYP17* foi amplificada por PCR com primers intrônicos anteriormente descritos¹⁷. Todos os fragmentos foram amplificados nas mesmas condições em um volume final de 50 µl. Após desnaturação inicial (94°C por 5 min), a PCR foi realizada por 35 ciclos de desnaturação (94°C por 60 seg), anelamento (58°C durante 30 segundos) e extensão (72°C por 90 segundos) em um termociclador (LIFE, Foster City, CA, EUA). Uma extensão final a 72°C por 7 min foi adicionada após o último ciclo.

3.2.3.3 PCR – *POR*

Os oligonucleotídeos iniciadores específicos complementares às regiões flangeadoras éxon-intron foram desenhados usando o *University of California Santa Cruz Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu>) e usando o *Primer 3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). O PCR foi realizado utilizando uma mistura de 20:1 de *Taq DNA polimerase* (Promega, Madison, WI, USA) e *Pfu DNA polimerase* (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA) 0,5:0,025 U/reação. A reação de amplificação foi realizada em termociclador automático com protocolo de ciclagem em *touchdown*: 95°C por 4 min, seguidos de 15 ciclos em *touchdown* de 95°C por 30", 67 °C por 30" (decrecendo 0,5°C a cada ciclo), e 72°C por 45", seguidos por 35 ciclos de 95°C por 30", 60°C por 30", e 72°C por 45". A reação de amplificação do éxon 1 foi realizada nas mesmas condições descritas para os demais éxons do *POR*, exceto que a temperatura de *annealing* inicial, nos 15 ciclos do *touchdown*, foi de 64°C, e, nos demais 35 ciclos, foi de 57°C. A extensão final foi realizada a 72°C por 7 min.

As amplificações de ambos os genes foram acompanhadas de um controle negativo (todos os reagentes, exceto o DNA) e um controle positivo (DNA genômico de um indivíduo normal) para confirmação da especificidade e eficiência da reação. As amostras amplificadas foram verificadas em gel de agarose 1%. Os produtos de PCR foram purificados por meio de pré-tratamento enzimático com a enzima *Exo SAP IT* (USB Corporation, Cleveland, OH, USA).

3.2.3.4 Sequenciamento – *CYP17* e *POR*

Os produtos de PCR foram purificados por meio de pré-tratamento enzimático com a enzima *Exo SAP IT* (USB Corporation, Cleveland, OH, USA). Todos os produtos de PCR foram, então, submetidos à reação de sequenciamento automático, utilizando o *kit ABI Prism BigDye™ terminator* versão 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e as mesmas sequências de oligonucleotídeos iniciadores (dideoxinucleotide). Os produtos

foram submetidos à eletroforese capilar em sequenciador automático de DNA e analisados por meio do *software ABI PRISM 3730 x 1 DNA Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e do *software DNA Sequencher 5.2* (Gene Codes, Ann Harbor, MI, USA). Os resultados foram comparados com a respectiva sequência selvagem depositada no GeneBank: CYP17 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GJ211931.1>) e POR (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000007.12).

3.2.3.5 Análise estatística

A correlação entre os volumes ovarianos pré e pós-tratamento foi realizada pelo teste de Wilcoxon (variáveis não paramétricas). A correlação entre as variáveis numéricas, valores laboratoriais e volumes ovarianos foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson. O valor de $p < 0,05$ foi estabelecido como estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa “SigmaStat” para Windows (version 3.5; SPSS, Inc., San Rafael, CA, USA).

3.3 Casos da revisão da Literatura

Foram realizadas pesquisas eletrônicas por meio de base de dados, incluindo PubMed, Medline, e EMBASE por meio de palavras-chave e termos como “CYP17”, “POR”, “CYB5”, “Hiperplasia Suprarrenal Congênita”, “17-alpha-hydroxylase deficiency”, “17,20-liase deficiency”, “Cistos ovarianos” e “Torção ovariana”. As listas de referências dos artigos identificados também foram pesquisadas e analisadas.

Cerca de 30 artigos relataram casos de pacientes com deficiência da atividade do P450c17. Destes, vinte artigos descreveram apenas 1 a 3 casos isolados ou não fizeram avaliação genética, sendo que 2 artigos descreveram casos isolados de mutação no CYB5, causando deficiência

isolada da 17,20-liase em pacientes 46,XY. Os dez estudos restantes foram de 4 ou mais casos, sendo 7 artigos sobre *CYP17* e 3 sobre *POR*, totalizando 113 casos. Um desses grandes estudos sobre *POR* relatou 7 casos já descritos em uma dessas “série de casos” anterior, e não descrevia avaliação ovariana. Dos 9 estudos restantes (83 casos), um estudo de *CYP17A1* não descreveu o cariótipo das pacientes, sendo excluído da pesquisa. Dos últimos 8 estudos (73 casos), 39 casos eram 46,XY, e foram excluídos do nosso estudo. Dos 34 casos 46,XX restantes, 20 casos não tinham descrição ovariana. Portanto, a nossa análise final foi de 14 pacientes 46,XX com deficiência do P450c17 (6 por mutações no *CYP17A1* e 8 na *POR*) com avaliação clínica, laboratorial, genética e ovariana^{29,33,34}.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Pacientes da coorte HCFMUSP

4.1.1 Pacientes com mutação no *CYP17A1*

4.1.1.1 Avaliação clínica

Das 17 pacientes com mutação no *CYP17A1*, a presença de consanguinidade foi observada em 4 famílias e 5 pacientes tinham outro parente afetado (Tabela 1 e Anexos A, B, D, E, F, G, H, I, J, K, L). A idade do primeiro atendimento foi de 11 a 37 anos.

Tabela 1 - Dados clínicos de pacientes 46,XX com deficiência da atividade do P450c17 – coorte do HCFMUSP

Família	Ptes	Cons	Idade (a)	Amenorreia	Altura (m)	Peso (Kg)	IMC	Estádio de Tanner	PAS (mmHg)	Outras comorbidades
I	1	não	27	Secundária	1,60	89	34.8	M3P2*	140x110	Adenoma adrenal, transtorno emocional
	2	não	23	Secundária	1,63	73	27	M3P3*	150x110	Cefaleia, transtorno emocional
	3	não	23	Primária	1,51	53	23.2	M2P2*	212x135	Torção ovariana; adenoma adrenal, transtorno emocional, síndrome do pânico
II	4	sim	19	Primária	1,6	54	21.3	M3P3*	150x110	Transtorno emocional, surto psicótico, transtorno afetivo Bipolar, esquizofrenia
III	5	sim	13	Primária	1,54	29	12.5	M2P3	80x60	Sd Antley Bixler (mutação da POR)
IV	6	não	30	Primária	1,62	53	19	M1P1	150x110	Transtorno emocional
	7	não	26	Primária	1,68	66	23.4	M3P1	150x110	Transtorno emocional
V	8	-	11	Primária	1,42	33	16.4	M1P1	97x70	Rotura cisto ovariano
VI	9	não	27	Primária	1,67	77	29.2	M1P1	160x120	Transtorno emocional
	10	não	35	Primária	-	-	-	M1P1	150x110	Transtorno emocional
VII	11	não	16	Secundária	1,74	67	22.2	M3P1	138x91	Transtorno emocional
VIII	12	sim	17	Primária	1,58	38	15	M1P1	140x105	Transtorno emocional
	13	sim	17	Primária	1,62	39	14.9	M1P2	150x110	Transtorno emocional
IX	14	-	17	Primária	1.71	47	16.1	M2P1	160x110	Transtorno emocional
X	15	sim	21	Secundária	1,66	53	19.3	M4P2	170x130	Torção ovariana
	16	sim	15	Secundária	1,55	55	22.7	M4P1	150x110	Hidrocefalia; pan-hipoptuitarismo
XI	17	-	14	Primária	1,68	80	28.3	M1P1	240x150	Convulsão, transtorno emocional
XII	18	sim	17	Primária	1,60	51	19.9	M2P1	120x80	Dor abdominal; transtorno emocional

Ptes: pacientes; cons: consanguinidade; *em uso de anticoncepcional oral; transtorno emocional: depressão e/ou ansiedade

A maioria das pacientes (70%) apresentou como queixa inicial amenorreia primária. Três pacientes (pacientes 3, 8 e 15) apresentaram como primeiro sintoma torção ovariana aos 14, 10 e 21 anos, respectivamente.

O desenvolvimento das mamas não ocorreu em 50% das pacientes, indicando a falta de produção de estrógeno. No entanto, o desenvolvimento espontâneo das mamas chegou a M4 em duas irmãs. Algumas pacientes apresentavam desenvolvimento mamário (estádio 2 ou 3 de Tanner) após tratamento com anticoncepcionais orais. Cerca de 90% das pacientes apresentavam ausência de pelos pubianos e axilares. Ao diagnóstico, 15 pacientes (88%) apresentavam hipertensão arterial. A idade óssea estava atrasada na maioria das pacientes, sendo que as que já chegaram em uso de anticoncepcionais orais apresentavam idade óssea compatível com a idade cronológica.

Em relação às outras comorbidades, 13 pacientes (76%) apresentam quadro de ansiedade ou depressão em graus variados. O teste de Hamilton, que avalia a presença de ansiedade e depressão, foi aplicado em 4 pacientes, sendo que as 4 apresentaram *score* >7 (valor de referência: até 7). O inventário de Beck foi aplicado para análise de depressão na paciente 1 que mostrou pontuação de 48 (normal: até 10) indicativa de depressão de grau moderado à grave. A paciente 3 apresentou síndrome do pânico, além de depressão e ansiedade, e a paciente 4 apresenta transtorno afetivo bipolar e teve esquizofrenia e um surto psicótico. As pacientes faziam uso de ansiolíticos e/ou antidepressivos e/ou antipsicóticos, como Sertralina, Fluoxetina, Amitriptilina, Clonazepam, Ácido Valproico, Risperidona e Biperideno. A maioria das nossas pacientes expressou grande preocupação com a provável infertilidade. As pacientes 1 e 3 apresentaram neoplasia benigna da suprarrenal bilateral, sendo a primeira submetida à suprarrenalectomia direita que revelou um adenoma do córtex suprarrenal.

A paciente 16 apresenta, concomitantemente, quadro de hipopituitarismo, não presente em sua irmã. Desde a infância, ela foi acompanhada por déficit de crescimento e hidrocefalia, tendo sido tratada com hormônio do crescimento, hormônio tireoidiano e glicocorticoides.

4.1.1.2 Avaliação Laboratorial pré e pós-tratamento

Cinco pacientes apresentaram o sódio no limite superior, e, em onze delas, o potássio estava no limite inferior ou abaixo do normal.

A progesterona estava aumentada em todas as pacientes, com níveis variando de 2 a 40 ng/mL. O nível de ACTH estava elevado na grande maioria delas, sendo que, em algumas pacientes, os níveis estavam muito aumentados.

Treze pacientes apresentaram cortisol abaixo da normalidade ou no limite inferior. A 17OH-progesterona sérica estava reduzida, normal ou aumentada. Os níveis dos androgênios (testosterona, DHEAS e androstenediona) estavam abaixo dos valores normais em todas as pacientes. A atividade plasmática da renina (APR) estava diminuída na maioria das pacientes antes do tratamento (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados laboratoriais pré-tratamento das pacientes 46,XX com deficiência da atividade do P450c17 da coorte do HCFMUSP

Família	Pacientes	LH (U/L)	FSH (U/L)	E2 (pg/mL)	Prog (ng/mL)	ACTH (pg/mL)	F (ug/dL)	17OHP (ng/mL)	T (ng/dL)	DHEAS (ng/mL)	A (ng/mL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	APR (ng/ml/h)
I	1	21	8	<13	33	220	17	2,3	<11	<80	<0,2	141	3,1	-
	2	14	8	22	5	120	4	1,2	<11	111	<0,2	140	3,3	0,7
	3	18	14	14	6	115	3	-	<11	<80	<0,3	141	3,7	0,9
II	4	9	6	-	8	287	16	3,9	<13	840	0,4	145	3,5	<0,2
III	5	19	13	17	17	39	8	9,7	<11	733	0,7			3,4
IV	6	60	70	17	2	225	1	5	-	-	-	131	4,7	-
	7	30	18	22	19	717	3	0,6	<10	<80	0,6	138	3	-
V	8	30	13	16	-	-	-	5,5	<10	<80	0,2			-
VI	9	32	139	<13	7	-	3	0,4	<14	<100	0,1	146	3,2	0,2
	10	69	128	<13	38	-	1	0,2	<14	<30	0,2	144	1,4	-
VII	11	27	19	13	3	112	5	-	<11	242	<0,3	142	4,1	-
VIII	12	240	>100	<20	5	116	1	0,2	<30	<19		142	2	0,3
	13	296	>100	-	12	39	2	0,6	16	170	-	145	2,7	0,1
IX	14	37	18	<20	13	112	2	0,8	15	<39	<0,3	145	2,5	0,1
X	15	42	12	<28	29	372	16	1,5	<10	<150	<0,3	139	4,1	0,1
	16	34	9	<28	6	1280	2	2,9	<10	<150	<0,3	139	4,2	-
XI	17	>9,3	>9,3	-	5,2	-	<5	-	<11	<80	<0,3	138	2,9	0,3
XII	18	26	22	14	40	81	1	1,5	<11	<80	<0,3	-	2,1	-
	VR	1,6-9,3	2,4-9,3	22-215	0,4-1	<80	5,4-25	0,4-1	<30-96	988-3400	0,7-2	135-145	3,5-5	0,2-2,8

E2: estradiol; Prog: progesterona; F: cortisol; 17OHP: 17hydroxyprogesterona; T: testosterona; A: androstenediona; APR: atividade plasmática da Renina;
VR: valores de referência

Todas as pacientes apresentaram aumento das gonadotrofinas hipofisárias, sendo o LH maior que o FSH em 13 delas. As duas pacientes com FSH maior que o LH são irmãs e os ovários não foram visualizados com a USG antes do tratamento, e o útero era hipoplásico. Todas as pacientes apresentaram níveis séricos de estradiol (E2) não mensurável ou no limite inferior da normalidade.

Após o tratamento com dexametasona 0,25-0,5 mg e estrógenos conjugados (0,625 mg/dia e acetato de medroxiprogesterona 5-10mg do 1º ou 12º dias do ciclo menstrual), a maioria apresentou queda nos níveis de gonadotrofinas e progesterona, mas não houve normalização do LH e da progesterona. O ACTH em quase todas as pacientes se normalizou após o tratamento com dexametasona.

4.1.1.3 Avaliação ovariana

Ao diagnóstico, 11 pacientes (65%) apresentavam aumento de, pelo menos, um dos ovários, sendo que cistos estavam presentes em 10 das 17 pacientes. Quatro pacientes já chegaram em uso de ACO, sem uso de glicocorticoide, e também apresentavam aumento ovariano.

Ao diagnóstico, o tamanho ovariano direito variou de 1 a 142 cm³, e o esquerdo de 5 a 203 cm³ (normal: 3 a 9 cm³) (Figuras 15, 16, 19, 24, 27, 30, 33, 36, 37, 41, 44, 49 nos Anexos). Em 4 pacientes, os ovários não foram visualizados na primeira consulta, e, em duas irmãs (casos 9 e 10), os níveis de FSH estavam mais elevados do que os níveis de LH, sugerindo associação com outra causa de falência ovariana primária. O tamanho dos cistos ovarianos variou desde menores que 1 cm até 6,1 cm no maior diâmetro. Três pacientes já chegaram com a história de cirurgia prévia de ovário devido a abdome agudo. As pacientes 3 e 15 apresentaram torção ovariana, sendo necessária a retirada do ovário comprometido por completo. A paciente 8 apresentou rotura de cisto ovariano, com consequente periapendicite, porém não foi necessária a ooforectomia total (Tabelas 1 e 3).

Tabela 3 - Avaliação ovariana pré e pós-tratamento das pacientes 46,XX da coorte do HCFMUSP

Paciente	Tempo de tratamento (Dex + ACO) anos	OD (VR: 3-6cm³)		OE (VR: 3-6cm³)		Útero (VR:30-60cm³)		Cistos ovarianos (cm)	
		Pré	Pós-tto	Pré	Pós-tto	Pré	Pós-tto	Pré	Pós-tto
1	0,3	14*	17	69*	18	13	11	-	
2	4,4	43*	65	6*	23	-	18	1 cisto OD	4,3x3,5 OD
	4,7		23		52		19		2,7x2,6 OE
3	1	142*	#	112*	6	10	25	Múltiplos	Sem cistos
4	4	53*	11	8*	10	14	19	5 x 3.9 OD	sem cistos
5	1,5	17	116	5	23	8.8	42	1 cisto OD	Mult OD e OE
6	3	25	18	nv	nv	7	9	1,2 OD	2 OD
7	1,5	21	3	10	3	6	18	< 1 OD e OE	sem cistos
8	Apenas ACO	62	6	74	8	11	3	1,5-3,0 OD /OE	sem cistos
9	1,2	nv	2	nv	3	1	26	-	
10	7	nv	12	nv	nv	5	43	-	
11	0,2	nr	nv	nr	nv	-	-	-	
12	22	nv	nv	nv	nv		54	-	
13	18	nv	nv	nv	nv		70	-	
14	6	19	nv	16	nv	3	-	Cistos	

continua

conclusão

Paciente	Tempo de tratamento (Dex + ACO) anos	OD (VR: 3-6cm ³)		OE (VR: 3-6cm ³)		Útero (VR:30-60cm ³)		Cistos ovarianos (cm)	
		Pré	Pós-tto	Pré	Pós-tto	Pré	Pós-tto	Pré	Pós-tto
15	GnRHa há 10 meses	36	12	203	#	nv	4	3,4 OD /4 OE	Sem cistos
	há 0,4 ano Prednisolona		74				3	-	6,1x4,8 OD
	há 0,6 ano Pred + ACO		5				26	-	Sem cistos
16	0,3	16		134		5		1,5 OD/E	
17	16	1	11	5	7	2,7	19	-	2,8x2,0OD
18	1	124	3,7	94	nv	3,2	10	múltiplos	Múltiplos

nv, não visualizado; nr: não realizado; * em uso de prévio de ACO (anticoncepcionais orais) apenas; OD: ovário direito; OE: ovário esquerdo; Dexa: dexametasona; Pred: prednisolona; # Ooforectomia prévia

Após o tratamento com dexametasona, estrógeno e progesterona, a maioria das pacientes apresentou diminuição da formação de grandes cistos e, conseqüentemente, do tamanho ovariano, exceto a paciente 2. Esta apresentou aumento do ovário direito à custa de cistos de até 4,3 cm, e aumento do ovário esquerdo com diminuição do direito, quatro meses após (ficou um período sem usar estrógenos para tratamento de fertilização). A paciente 15 foi, inicialmente, tratada com análogo de GnRH, havendo redução dos cistos e do tamanho ovariano. Após a suspensão desse tratamento, voltou a apresentar aumento ovariano, que só regrediu com o uso concomitante de glicocorticoide e estrogênios.

O útero era hipoplásico em todas as pacientes, variando de 1 a 14 cm³. Com o uso de estrogênios e progestogênios, houve aumento do volume uterino em 7 das pacientes, mas ainda não atingindo o volume normal na maioria, provavelmente pela inadequada aderência ao tratamento. Em três pacientes, o volume uterino atingiu o tamanho normal (30 a 90 cm³).

4.1.1.4 Análise molecular do gene *CYP17A1*

Das 18 pacientes, 17 apresentam mutação no *CYP17A1* (Figuras 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 43, 46, 51 nos Anexos)

Em 4 pacientes (casos 9, 10, 12 e 13) as mutações no *CYP17A1* já haviam sido previamente identificadas por pesquisadores da nossa instituição^{12,13} e as demais fizeram parte do nosso estudo atual (Tabela 4). Em uma das pacientes ainda não previamente estudada (caso 8), encontramos a mutação p.W406R no éxon 7 em heterozigose composta, mas não encontramos a segunda mutação. Uma nova mutação foi encontrada, que está localizada no éxon 8 e gerou a troca de guanina para adenina no nucleotídeo 7337 (c.7337G> A), levando à substituição do aminoácido glicina por serina no códon 478 (p.G478S) e, nesta paciente, aparece em estado de heterozigose composta com a mutação g.3997_4026del.

A nova mutação não foi encontrada no *1000 Genomes* e as ferramentas de previsão *in silico* *Polyphen*, *Sift*, e *Mutation Taster* previram essa variante p.G478S como deletéria para função da proteína (Figuras 39 e 40 nos Anexos).

As mutações foram segregadas em 5 famílias, de forma compatível com uma herança autossômica recessiva, sendo os pais estudados carreadores da mutação.

Tabela 4 - Alterações moleculares das pacientes 46,XX com deficiência da atividade do P450c17 na coorte do HCFMUSP

Família	Paciente	Gene	Mutação	Referência
I	1	<i>CYP17A1</i>	exon 7 (p.W406R)/exon 8 (p.P428L)	Estudo atual
	2	<i>CYP17A1</i>	exon 7 (p.W406R)/exon 8 (p.P428L)	
	3	<i>CYP17A1</i>	exon 7 (p.W406R)/exon 8 (p.P428L)	
II	4	<i>CYP17A1</i>	exon 6 (p.Y329D)/exon 6 (p.Y329D)	Estudo atual
III	5	<i>POR</i>	exon 8 (p.A287P)/exon 8 (p.A287P)	Estudo atual
IV	6	<i>CYP17A1</i>	exon 7 (p.W406R) / exon 7 (p.R416H)	Estudo atual
	7	<i>CYP17A1</i>	exon 7 (p.W406R) / exon 7 (p.R416H)	
V	8	<i>CYP17A1</i>	exon 8 (p.R449C) / exon 8 (p.F417C)	Estudo atual
VI	9	<i>CYP17A1</i>	exon 7 (p.W406R) / exon 6 (p.R362C)	Martin RM <i>et al.</i> , JCEM 2003
	10	<i>CYP17A1</i>	exon 7 (p.W406R) / exon 6 (p.R362C)	
VII	11	<i>CYP17A1</i>	exon 7 (p.W406R) / ?	Estudo atual
VIII	12	<i>CYP17A1</i>	exon 7 (p.W406R) / exon 7 (p.W406R)	Costa- Santos M JCEM 2004
	13	<i>CYP17A1</i>	exon 7 (p.W406R) /exon 7 (p.W406R)	

continua

				conclusão
Família	Paciente	Gene	Mutação	Referência
IX	14	<i>CYP17A1</i>	exon 8 (p.G478S)*/ g.3997_4026del)	Estudo atual
X	15	<i>CYP17A1</i>	exon 8 (p.P428L) / exon 8 (p.P428L)	Estudo atual
	16	<i>CYP17A1</i>	exon 8 (p.P428L) / exon 8 (p.P428L)	
XI	17	<i>CYP17A1</i>	exon 6 (p.R362H) / exon 6 (p.R362H)	Estudo atual
XII	18	<i>CYP17A1</i>	exon 7 (p.R416H)/exon 7(p.R416H)	Estudo atual

*Mutação Nova

4.1.2 Caso clínico da paciente da coorte HCFMUSP com mutação no gene *POR*

Apenas uma paciente apresentou mutação no gene *POR*. Esta paciente, caso 5, era filha de pais consanguíneos e o diagnóstico de síndrome Antley-Bixler foi feito pelos geneticistas aos 2 anos de idade por apresentar malformações congênitas típicas da síndrome. A paciente nos foi encaminhada aos 13 anos para avaliar o desenvolvimento puberal. Ela negava telarca e menarca, e apresentava pressão arterial normal. Apresentava níveis elevados de gonadotrofinas hipofisárias e baixos níveis de estradiol e andrógenos. Os mais altos níveis séricos de 17OH-progesterona foram encontrados nesta paciente, e os níveis de progesterona também estavam aumentados. A atividade da renina plasmática era ligeiramente elevada, em contraste aos níveis suprimidos encontrados nas pacientes com mutação no *CYP17A1*.

O USG mostrou um ligeiro aumento do ovário direito antes do tratamento, e aumento importante nos ovários mesmo após o tratamento com dexametasona e contraceptivos orais irregularmente, principalmente do ovário direito, que atingiu um volume de 116 centímetros. O útero atingiu um volume normal após reposição estrogênica (Figura 21 no Anexo C).

A paciente foi submetida à plástica facial para correção dos defeitos faciais com bons resultados (Figura 7).

Nesta paciente foi identificada a mutação homozigota p.A287P no gene do *POR* previamente escrita (Tabela 4 e Figura 20 no Anexo C)

Figura 7 - Ilustração da paciente HCFMUSP após a cirurgia para correção dos defeitos faciais

4.1.3 Análise estatística dos valores laboratoriais das pacientes da coorte do HCFMUSP

Observamos pela correlação de Pearson que, quanto maior o valor de FSH, menor o volume ovariano, sendo essa correlação negativa moderada ($r=-0,47$), mas significativa ($p<0,05$). Também observamos que, quanto maior o valor de LH, menor o volume ovariano, correlação negativa moderada ($r=-0,31$) e não significativa ($p>0,05$). Quanto maior a relação LH/FSH, maior o volume ovariano, correlação positiva moderada ($r=0,35$), também não significativa ($p=0,14$), e, quanto maior o valor da progesterona, maior o volume ovariano, correlação positiva moderada ($r=0,32$), e também não significativa ($p=0,2$) (Figuras 8 a 11).

Observamos que houve diminuição da média do volume ovariano total após a terapia com glicocorticoide, associado a estrógenos e progestágenos ou com análogo do GnRH. A média de volume ovariano total pré-tratamento foi $72,8 \pm 87,8 \text{ cm}^3$, e a média de volume ovariano total pós-tratamento foi $23,3 \pm 37,8 \text{ cm}^3$, $p=0,104$.

Figura 8 - Correlação entre os níveis basais de FSH e o volume ovariano. Correlação de Pearson, $r=-0,47$; $p<0,05$

Figura 9 - Correlação entre os níveis basais de LH e o volume ovariano. Correlação de Pearson, $r=-0,31$, $p=0,2$

Figura 10 - Correlação entre os níveis da relação LH/FSH e o volume ovariano. Correlação de Pearson, $r:0,35$; $p=0,14$

Figura 11 - Correlação entre os níveis basais de progesterona e o volume ovariano. Correlação de Pearson, $r:0,32$; $p=0,2$

4.2 Revisão da Literatura

A nossa análise se resumiu a 4 artigos que continham avaliação completa (clínica, laboratorial, genética e ovariana) de pacientes 46,XX com deficiência da atividade do P450c17, sendo 14 pacientes (6 com mutação no gene *CYP17A1* e 8 com mutação no gene *POR*).

4.2.1 Deficiência da atividade do P450c17 devido à mutação no gene *CYP17A1*

4.2.1.1 Avaliação Clínica

Seis pacientes foram descritas^{33,35} A idade do diagnóstico foi, em média, de 23 anos, variando de 17 a 36 anos. Cerca de 50% das pacientes apresentaram ausência de telarca e amenorreia primária. Uma paciente referiu desenvolvimento completo das mamas espontaneamente. A hipertensão arterial estava presente em uma das 6 pacientes. Não foi avaliada a presença de transtornos emocionais nessas pacientes.

4.2.1.2 Avaliação Laboratorial

A progesterona e a 17OH-progesterona estavam elevadas em todas as pacientes. O ACTH estava elevado em 5 pacientes e, em uma, no limite superior da normalidade. Uma paciente apresentou potássio abaixo do normal. A atividade plasmática da renina estava abaixo do normal em 3 pacientes e, nas outras 3, não foi dosada (Tabela 5).

Tabela 5 - Mediana e variação dos valores laboratoriais das pacientes 46,XX com mutação no *CYP17A1* ou no *POR* publicadas na literatura

Gene/n		LH U/L	FSH U/L	E2 pg/mL	Prog ng/mL	ACTH pg/mL	17OHP ng/mL	F ug/dL	T ng/dL	A ng/mL	K mEq/L	APR ng/ml/h
<i>CYP17A1</i>	Mediana	18	10	19	23	129	4,55	9	10	0,2	4,15	0,2
n=6	Variação	12-27	4-18	9-22	9-48	75-446	1,9-9,3	2-12,5	2,9-14,7	0,2	3,4-4,7	0 - 0,3
<i>POR</i>	Mediana	19	12,6	23	12	86	12	9,85	22	0,7	-	18
n=8	Variação	1,3-53	3,9-29	11-25	2,8-80	14-158	5-39,6	2,3-22	14-179	0,17-1,3	-	2-34
VR		1.6-9.3	2.4-9.3	22-215	0,4-1	<80	0,4 – 1	5,4-25	<96	0,7-2	3,5-5	0,2-2,8

Todas as pacientes apresentavam as gonadotrofinas aumentadas, sendo que, em 100% delas, o LH era maior que o FSH. O estradiol e a testosterona estavam abaixo do normal em todas as pacientes.

4.2.1.3 Avaliação Ovariana

Todas as pacientes apresentavam aumento ovariano de, pelo menos, um dos ovários com presença de cistos em todas as pacientes. O volume ovariano chegou a 87cm³ em uma das pacientes. E, em outra, um único cisto chegou a apresentar 5x3,7cm nos seus maiores diâmetros. Três delas apresentavam dores abdominais frequentes e foram submetidas à cistectomia ovariana antes do tratamento oral. Com o tratamento com estrógeno (associado ou não a progesterona), houve apenas diminuição ou não houve desaparecimento dos cistos na maioria das pacientes. Mas, associando o anticoncepcional oral ao glicocorticoide, houve importante redução dos cistos e ausência de recidivas.

4.2.1.4 Avaliação Molecular

Quatro pacientes apresentam mutação no *CYP17A1* em heterozigose composta, uma em homozigose, e em uma paciente somente uma mutação em heterozigose foi encontrada^{33,35}. (Tabela 6).

Tabela 6 - Mutações no *CYP17A1* e no *POR* em pacientes 46,XX já descritas na literatura

Paciente	Gene	Mutação	Referências
1	<i>CYP17A1</i>	p.Y329K / p.A398V	Tian Q <i>et al.</i> , 2011
2	<i>CYP17A1</i>	p.P409R / 9bp Del D487-F489	Tian Q <i>et al.</i> , 2011
3	<i>CYP17A1</i>	p.Y329K / p.R449C	Tian Q <i>et al.</i> , 2011
4	<i>CYP17A1</i>	p.R449C / p.R96Q	Tian Q <i>et al.</i> , 2011
5	<i>CYP17A1</i>	p.L209P / ?	Tian Q <i>et al.</i> , 2011
6	<i>CYP17A1</i>	p.R416H	Rosa S <i>et al.</i> , 2007
7	<i>POR</i>	p.A287P / p.R457H	Idkowiak J <i>et al.</i> , 2011
8	<i>POR</i>	p.A287P / p.A287P	Idkowiak J <i>et al.</i> , 2011
9	<i>POR</i>	p.A287P / p.A287P	Idkowiak J <i>et al.</i> , 2011
10	<i>POR</i>	p.T142A / p.Y376L fsX74	Idkowiak J <i>et al.</i> , 2011
11	<i>POR</i>	p.A287P / p.R223X	Idkowiak J <i>et al.</i> , 2011
12	<i>POR</i>	p.N185K / p.L577R	Sahakitrungruang T <i>et al.</i> , 2009
13	<i>POR</i>	p.G539R / fs1363delC	Sahakitrungruang T <i>et al.</i> , 2009
14	<i>POR</i>	p.G539R/fs697-698insGAAC	Sahakitrungruang T <i>et al.</i> , 2009

4.2.2 Deficiência da atividade do P450c17 devido à mutação no gene da *POR*

Oito pacientes com quadro clínico, laboratorial, aspectos genéticos e também imagens de ovário foram relatados^{29,34}.

4.2.2.1 Avaliação clínica

Na avaliação clínica das pacientes 46,XX com alteração no gene da *POR*, nos dois trabalhos acima citados que continham avaliação ovariana, observamos que, das 8 pacientes, 6 apresentaram genitália ambígua ao nascimento, e duas apresentavam genitália externa feminina normal. Em 4 pacientes, sinais de alteração óssea da síndrome de Antley Bixler (SAB) já foram notados desde o nascimento, inclusive uma das pacientes apresentou desconforto respiratório ao nascer devido à estenose de coanas. Em 3 pacientes, os sinais ósseos da SAB só foram diagnosticados na

adolescência, sendo que uma delas apresentava baixa estatura e grau avançado de escoliose. O diagnóstico definitivo de deficiência da *POR*, clínico, laboratorial e genético, só foi estabelecido na faixa etária variando de 12 a 23 anos em 7 pacientes, e apenas em uma paciente foi feito logo após o nascimento, devido ao estresse respiratório e aos sinais ósseos típicos da SAB. Apenas uma paciente apresentou amenorreia secundária, e uma ainda está em idade pré-púbere. Todas as pacientes apresentaram, ao menos, o grau 2 de desenvolvimento puberal espontaneamente, seja por mamas e/ou pelos pubianos, sendo que uma paciente chegou ao desenvolvimento completo das mamas sem medicações. Esta apresentava apenas amenorreia primária e infertilidade, e não apresenta as alterações esqueléticas da SAB. Em nenhuma das 8 pacientes, foi descrita hipertensão arterial, e, na paciente que foi diagnosticada com deficiência da *POR* no período neonatal, o sódio plasmático estava reduzido, sendo necessário introduzir inclusive fludrocortisona, além de hidrocortisona, assemelhando-se à alteração enzimática em nível do *CYP21A2* forma clássica perdedora de sal. Também não foram avaliados transtornos emocionais nessas pacientes.

4.2.2.2 Avaliação laboratorial

Das pacientes da literatura analisadas com mutação na *POR* e avaliação ovariana, 50% apresentavam LH aumentado e, em 62,5%, o FSH estava elevado, sendo que o LH era maior que o FSH em 5 de 7 pacientes (as gonadotrofinas da paciente recém-nascida não foram descritas). O estradiol estava abaixo do normal ou no limite inferior da normalidade em todas as pacientes. A progesterona e a 17OH-progesterona estavam aumentadas em todas as pacientes em que foram dosadas. A testosterona estava reduzida em todas as pacientes, exceto na paciente recém-nascida, a qual nasceu com o maior grau de virilização e sinais semelhantes à deficiência da 21-hidroxilase. O DHEAS estava normal em 3 pacientes e reduzido em 4. Apenas em 50% das pacientes, o ACTH estava elevado. Apenas uma paciente apresentou hiponatremia (Tabela 5).

4.2.2.3 Avaliação ovariana

Em relação à avaliação ovariana, 75% apresentavam aumento de, pelo menos, um dos ovários e tinham dores pélvicas ou abdominais frequentes. Uma paciente apresentava tamanho normal dos ovários e, em apenas uma, os ovários não foram visualizados. Todas as pacientes que apresentavam aumento ovariano apresentaram cistos, sendo que, em uma delas, o cisto chegou a apresentar 7 cm em seu maior diâmetro. Houve rotura de cistos ovarianos bilaterais em uma das pacientes, sendo necessária ooforectomia bilateral, em outra, foi necessária realização de cistectomia bilateral antes de tentar o tratamento oral. E foi necessária punção do cisto ovariano para drenagem em uma paciente com 4 meses de vida. Em 88%, o útero era hipoplásico ao diagnóstico. Nas pacientes em que foi tentado o tratamento apenas com estrógenos (ou estrógenos e progesterona), os cistos não desapareceram ou houve apenas moderada regressão, porém, quando as pacientes usaram estrógeno e glicocorticoide associados, houve regressão completa dos cistos, sem recorrência. Apenas em uma paciente que fez uso apenas de estrógenos e progesterona, sem glicocorticoide, os cistos não recorreram até o momento.

4.2.2.4 Avaliação Molecular

Seis pacientes apresentaram a mutação no gene da *POR* em heterozigose composta, e 2 pacientes em homozigose. A mutação mais prevalente foi a p.A287P em 50% das pacientes (Tabela 6).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O P450c17 é uma enzima que cataliza duas atividades distintas, a 17 α -hidroxilação e a 17,20-liase¹⁵. A deficiência da atividade do P450c17 em pacientes 46,XX se caracteriza, em geral, pelo quadro de amenorreia primária ou secundária com hipodesenvolvimento ou ausência dos caracteres sexuais secundários associado ou não à hipertensão arterial.

Na literatura, há relatos isolados de pacientes 46,XX com alteração da atividade do P450c17 que apresentam ovários macrocísticos, e até queixa clínica inicial de torção de ovários, seja por alteração do *CYP17A1*, *POR* ou *CYB5* (deficiência isolada da 17,20-liase)^{16,31}. No entanto, uma revisão recente sobre a fertilidade nestas pacientes descreveu os ovários destas pacientes como atróficos³⁶.

Nosso objetivo foi avaliar retrospectivamente os casos de pacientes da nossa coorte e de estudos já descritos na literatura portadores de deficiência da atividade do P450c17, confirmados por caracterização do defeitos moleculares no *CYP17A1* ou no *POR*, com foco nas pacientes 46,XX, e na função e morfologia ovarianas,

Um fato que chama a atenção é que a maioria das pacientes, tanto de nossa instituição quanto da revisão da literatura, procurou o atendimento médico tardiamente para uma doença que é congênita. Este fato decorre da ausência de insuficiência suprarrenal primária, apesar dos níveis baixos de cortisol, pela ação glicocorticoide da corticosterona, cujos níveis estão elevados na deficiência do P450c17^{6,15,17}.

5.1 Pacientes com mutações no *CYP17A1*

O principal fenótipo de apresentação deste defeito nos casos da nossa instituição foi a amenorreia primária e ausência do desenvolvimento das

mamas, indicando a gravidade do defeito enzimático afetando a produção de estrógeno. A ausência de pelos pubianos e axilares foi verificada em 90% das pacientes, porém não foi uma queixa espontânea das pacientes. Todas as pacientes apresentavam HAS, exceto duas delas, por razões não definidas.

Nas pacientes da literatura, 64% apresentavam graus variados de desenvolvimento mamário espontâneo. A ausência de pelos pubianos ou axilares também foi referida pela maioria delas. Apenas 1 paciente com apresentou HAS, enquanto que as demais eram normotensas, indicando ser a hipertensão arterial variável nestas pacientes e a sua ausência não pode excluir este diagnóstico. As outras 5 pacientes com pressão arterial normal foram classificadas com tendo deficiência parcial da 17 α hydroxylase ou deficiência isolada da 17-20liase. Porém, a distinção entre ambas não é possível estabelecer apenas pelo quadro clínico ou pelos exames laboratoriais, mas através do estudo funcional de cada mutação².

A comorbidade associada mais frequente em nossas pacientes foram os distúrbios psiquiátricos representados principalmente por depressão e/ou ansiedade em graus variados, presentes em mais da metade delas, sendo necessário uso constante de antidepressivos e/ou ansiolíticos. Questionando os autores de outro trabalho, em pacientes brasileiras, obtivemos a comunicação pessoal de que 4 pacientes descritas também apresentavam transtornos emocionais com graus variados de depressão e/ou ansiedade, e fazem uso de antidepressivos, mas essa avaliação não foi descrita neste artigo¹¹. As razões desta associação permanecem desconhecidas. O fato de o *CYP17A1* estar expresso no sistema nervoso central nos faz especular que a redução de sua expressão possa ter um papel no desenvolvimento dos distúrbios psiquiátricos encontrados em nossas pacientes⁸. Não encontramos referências de alterações psicológicas das pacientes nos demais casos descritos na literatura.

Duas irmãs de nossa coorte e uma paciente da revisão de literatura apresentaram adenomas de suprarrenal e uma paciente da literatura apresentou aumento do tamanho das suprarrenais bilateralmente¹⁶. Os

pacientes com qualquer tipo de hiperplasia suprarrenal congênita são mais susceptíveis a aumento de adrenais e até formação de nódulos, devido à própria fisiopatologia da doença, ou seja, pelo estímulo constante pelo ACTH³⁷.

Os níveis de progesterona estavam elevados em todas as pacientes da nossa coorte, assim como nos casos descritos que avaliaram os níveis de progesterona, indicando que a dosagem basal de progesterona é um excelente marcador da deficiência da atividade do P450c17^{13,14}. A APR estava diminuída na maioria das pacientes, indicando efeito mineralocorticoide da desoxicorticosterona.

Em relação à avaliação ovariana das pacientes da nossa coorte e da literatura juntas, cerca de 77% apresentaram aumento ovariano, pelo menos, unilateral e cerca de 80% destas apresentaram cistos ovarianos. O maior volume de ovário diagnosticado foi de uma das nossas pacientes, com 203 cm³, o qual apresentou torção e foi necessária a ooforectomia de urgência. Na literatura, uma paciente chinesa, com mutação no *CYP17A1*, apresentou um volume ovarino de 87 cm³, formando massa cística, e uma paciente Italiana apresentou cistos de até 7 cm de diâmetro. Oito pacientes tiveram torção ovário e/ou rotura de cisto ovariano ou foram submetidas a cistectomia¹⁶.

A torção de ovário é uma das causas mais comuns de dor abdominal de origem anexial, necessitando de intervenção o mais precocemente possível, na tentativa de manter a viabilidade do ovário comprometido, que se manifesta quando o ovário e seu pedículo se enrolam no ligamento suspensor do ovário. Inicialmente, a torção compromete a drenagem linfática e venosa, ocasionando edema e aumento de volume do ovário comprometido, e, com o passar do tempo, a circulação arterial também é acometida, resultando em trombose, isquemia e, por fim, em infarto hemorrágico. Em geral, o diagnóstico é bem definido pela ultrassonografia (US) associada ao Doppler.

A primeira mutação no *CYP17A1* foi descrita por Kagimoto *et al.* em 1988²⁶. Em um estudo brasileiro multicêntrico, as mutações p.W406R e p.R362C foram identificadas em vários pacientes, principalmente em famílias com ancestrais espanhóis e portugueses, respectivamente, sugerindo que as duas ascendências contribuíram independentemente para o aumento da prevalência de deficiência da 17-hidroxilase no Brasil¹². O enfoque deste estudo foi, principalmente, a análise molecular do *CYP17A1*, e nenhuma ênfase foi dada na avaliação ovariana. Em outro recente estudo brasileiro, com 4 novos casos de deficiência da 17 α -hidroxilase/17,20-liase, as pacientes também apresentavam ascendência espanhola e portuguesa, e também apresentavam essas respectivas mutações citadas¹¹. A maioria das nossas pacientes não sabia relatar com certeza a sua origem étnica, visto que o Brasil é um país de grande miscigenação de raças, e, raramente, as ascendências são conhecidas. O nosso caso 8 é natural da Colômbia e o 18 é natural da Argentina. As pacientes da revisão de literatura eram oriundas dos 5 continentes, de diversos países, principalmente nos estudos multicêntricos. Houve uma predominância de pacientes chinesas e brasileiras com alteração no *CYP17A1*, e de europeias (caucasianas) e norte-americanas com alteração do *POR*.

A mutação mais frequente em nossa casuística foi a p.W406R no éxon 7, seja em homozigose, ou em heterozigose composta, confirmando os achados do estudo brasileiro prévio¹². As mutações no *CYP17A1* encontradas em pacientes brasileiras diferem das encontradas na maioria das pacientes já relatadas na literatura oriundas de outros países.

5.2 Pacientes com mutações no *POR*

A deficiência da *POR* é uma causa de hiperplasia suprarrenal congênita, e, na sua forma grave, caracteriza uma síndrome de malformações esqueléticas, Antley-Bixler (SAB), e ambiguidade genital em ambos sexos, por alterações na esteroidogênese²¹. Na nossa casuística,

apenas uma paciente apresentou alteração da *POR*, e esta apresentava também alterações esqueléticas como a cranioossinostose e dismorfismo facial. Até o momento, não se sabe qual a relação da mutação da *POR* com as alterações esqueléticas. Há casos descritos em que as pacientes apresentavam mutação no gene *POR* associada apenas à ambiguidade genital, sem alterações esqueléticas, ou seja, formas leves podendo apresentar apenas infertilidade e alterações discretas na esteroidogênese²¹. Também se sabe que é possível a presença apenas das alterações ósseas da SAB, sem alterações na esteroidogênese ou ambiguidade genital se houver mutação no fator de crescimento de fibroblastos, sem alteração da *POR*³⁸.

O quadro clínico mais frequente nas pacientes 46,XX foi a presença de ambiguidade genital presente em 6/8 pacientes pelo efeito inativador da atividade de outras enzimas P450. Uma das pacientes apresentou quadro clínico muito semelhante à forma perdedora de sal da deficiência da 21-hidroxilase com hiponatremia e níveis elevados de 17OH-progesterona, de testosterona e APR³⁴. Possivelmente, a mutação na *POR* dessa paciente é mais evidenciada ao nível do P450c21, do que ao nível do P450c17. Nenhuma paciente da literatura com mutação no gene *POR* apresentou HAS. Como é sabido, o *POR* atua não só na atividade da P450c17, mas também na P50c21. Sendo assim, o excesso do efeito mineralocorticoide da desoxicorticosterona não é observado nessas pacientes.

A mutação p.A287P no gene *POR*, identificada em nossa paciente, foi a mais prevalente na literatura, presente em 55,5% das pacientes descritas.

A presença de macrocistos ovarianos foi descrita em pacientes 46,XX com mutação do *POR*²⁹. Neste trabalho, foram aventados dois possíveis mecanismos que levam a aparecerem de cistos ovarianos em pacientes do sexo feminino com alteração da *POR*. Primeiramente, a deficiência na síntese de estrogênios com consequente estimulação dos ovários pelo aumento das gonadotrofinas. O outro mecanismo seria a redução da atividade do *CYP51A1*, que requer transferência de elétrons a partir da *POR* para catalisar a conversão de lanosterol a MAS (esteroide ativador de

Na maioria das pacientes com mutação no *CYP17A1* ou *POR*, o tratamento com reposição de estrogênios e dexametasona, concomitantemente, resultou em redução da formação de cistos ovarianos.

Não há relatos de fertilidade espontânea dessas pacientes na literatura. Técnicas de fertilização assistida já foram utilizadas em outros centros, mas sem resultado positivo³⁶. Uma das pacientes da nossa coorte (caso 2) obteve sucesso na gestação por meio de fertilização *in vitro*, gerando um menino saudável, atualmente com 1 ano e 6 meses de vida. Esta paciente recebeu doses elevadas de estrógeno durante o primeiro semestre da gestação mimetizando os níveis elevados da gravidez associado ao tratamento com dexametasona (0.25-0.5 mg/dia) mantido durante toda a gestação.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A revisão retrospectiva dos dados de pacientes 46,XX com deficiência da atividade do P450c17 devido a mutações no gene *CYP17A1* ou no gene *POR* de uma coorte brasileira e de casos já descritos na literatura nos permitiu descrever detalhadamente as características fenotípicas e genotípicas destes raros defeitos genéticos quais sejam:

6.1 Na deficiência da atividade do P450c17 devido à mutação no gene *CYP17A1* (n=23)

- A principal queixa clínica inicial foi a amenorreia primária relatada em 73% dos casos. A telarca ocorreu em 50% das pacientes e o desenvolvimento espontâneo das mamas até M4 foi observado em 13% dos casos. Cerca de 90% das pacientes apresentavam ausência de pelos pubianos e axilares, o que indica ser este sinal um alerta para o diagnóstico de deficiência do *CYP17A1*, principalmente quando associado à hipertensão arterial que esteve presente em 69% dos casos.

- Em relação às outras comorbidades, 76% das pacientes apresentam quadro de ansiedade ou depressão em graus variados. A presença de adenoma de suprarrenal foi identificada em 17% dos casos.

- Os níveis de ACTH estavam elevados na grande maioria dos pacientes, enquanto que os níveis de cortisol estavam abaixo da normalidade ou no limite inferior. Os níveis séricos de progesterona estavam aumentados em todas as pacientes, mostrando ser este hormônio de valor diagnóstico da deficiência do *CYP17A1*. Todas as pacientes apresentaram aumento das gonadotrofinas hipofisárias, sendo o LH maior que o FSH em 78% delas. Os níveis dos androgênios e do estradiol estavam abaixo dos valores normais em todas as pacientes avaliadas.

- Ao diagnóstico, 65% das pacientes apresentavam aumento de, pelo menos, um dos ovários, sendo que cistos estavam presentes em 53% das pacientes. Três pacientes referiram história de cirurgia prévia de ovário devido a abdome agudo.

- Identificamos mutações deletérias em todas as pacientes estudadas, sendo, no gene *CYP17A1*, em 17 pacientes e, no gene *POR*, em uma paciente com a síndrome de Antley Bixler. Identificamos uma nova mutação no *CYP17A1* na coorte brasileira: a (p.G478S) identificada em heterozigose composta com a mutação intron3-éxon 4 (g.3997_4026del).

6.2 Na deficiência da atividade do P450c17 por mutação no gene *POR* (n=9)

- A queixa clínica mais frequente foi a ambiguidade genital presente em 75% dos casos, seguida dos sinais da síndrome de Antley Bixler (SAB) presentes em 87,5% dos casos. A maioria das pacientes apresentou desenvolvimento puberal espontaneamente e nenhuma das pacientes era hipertensa.

- A progesterona e a 17OH-progesterona estavam aumentadas em 89% das pacientes e o ACTH plasmático estava elevado em 50% das pacientes. O níveis séricos de LH estava aumentado em 77% dos casos e o FSH em 61,5%. O estradiol estava abaixo do normal ou no limite inferior da normalidade em todas pacientes.

- O aumento dos ovários foi observado em 77% das pacientes que apresentavam, pelo menos, um dos ovários aumentados e com macrocistos.

- A mutação p.A287P no gene *POR*, identificada em nossa paciente, foi a mais prevalente na literatura, presente em 55,5% das pacientes descritas.

Não observamos correlação entre os níveis de LH, da relação LH/FSH e de progesterona com o volume ovariano nos dois defeitos.

O tratamento com estrógenos, ou com estrógenos e progesterona, e glicocorticoides foi efetivo na redução dos cistos ovarianos tanto nos defeitos do *CYP17A1* quanto nos defeitos do gene *POR*.

Em conclusão, da análise retrospectiva do fenótipo, genótipo e morfologia ovariana de trinta e duas pacientes 46,XX portadoras de deficiência da atividade P450c17, enfatizamos a importância da dosagem da progesterona basal para este diagnóstico; a alta prevalência de aumento dos ovários com a presença de macrocistos ovarianos com risco de torção; e os transtornos psiquiátricos identificados em nossa coorte. Acreditamos que esta revisão possa contribuir para o diagnóstico mais precoce desta rara doença congênita.

7 ANEXOS

7.1 ANEXO A - Família 1 – Pacientes 1, 2 e 3

Figura 13 – Heredograma da família das pacientes 1, 2 e 3

Figura 14 - Mutação no *CYP17* éxon 7 (TGG/CGG) – p.P428L e no éxon 8 (CCG/CTG) –p.W406R (heterozigose composta) das pacientes 1, 2, 3

Figura 15 – Ultrassonografia pélvica da paciente 2 evidenciando ovário direito medindo 4,2x2,8x3,8 (VT=23,5cm³) com múltiplos cistos e ovário esquerdo medindo 6,1x3,6x4,5 (VT=51,6cm³) com um cisto dominante: de 2,7x2,6cm.

Figura 16 – Ultrassonografia pélvica da paciente 3 mostrando formação cística complexa, multisseptada medindo 8,9x4,8x6,2 (VT: 112,12cm³) em ovário esquerdo.

7.2 ANEXO B - Família 2 – paciente 4

Figura 17 - Heredograma da Família da paciente 4

Figura 18 - Mutação no *CYP17* éxon 6 (TAC/GAC) p.Y329D (homozigose) da paciente 4

Figura 19 - Ultrassonografia pélvica da paciente 4 evidenciando ovário direito medindo 11,8 cm³ (3,5x2,4x2,7) com imagem anecoica de 2,0cm diâmetro sugestiva de cisto. Na região anexial esquerda, imagem anecoica de 5,0x3,1x3,9 (31,8cm³); Útero hipotrófico.

7.3 ANEXO C - Família 3 – paciente 5

Figura 20 - Mutação no gene da *POR* homozigota p.A287P no éxon 8 (859G>C) na paciente 5

Figura 21 – Ultrassonografia pélvica da paciente 5 evidenciando ovário direito com dimensões aumentadas, à custa de múltiplas imagens císticas, algumas com paredes espessadas e com finos septos no seu interior, medindo cerca de 7,4 x 4,2 x 7,0 cm, com cerca de 116,0 cm³.

7.4 ANEXO D - Família 4 – Pacientes 6 e 7

Figura 22 – Heredograma da família 4, pacientes 6 e 7

Figura 23 - Mutação no *CYP17A1* éxon 7 (TGG/CGG) p.W406R e mutação Éxon 7 (CGT/CAT) p.R416H, presentes nas pacientes 6 e 7

Figura 24 – Ultrassonografia pélvica da paciente 6 evidenciando ovário esquerdo medindo 5,0x3,6x4,4cm VT: 41cm³ com múltiplos folículos de diâmetros variados.

7.5 ANEXO E - Família 5 – paciente 8

Figura 25 – Heredograma da família 5, paciente 8

Figura 26 - Mutação no *CYP17A1* éxon 8 (CGC-TGC) – p.R449C

Figura 27 – Ultrassonografia pélvica mostrando ovário direito medindo 6,2 x 4,4 x 4,2 cm (vol. 62cm³); ovário esquerdo 5,8 x 6,3 x 3,8 cm (vol. 74cm³); ovários com folículos corticais múltiplos periféricos que oscilam entre 1,5 e 3 cm, imagens de conteúdo líquido ecogênico espesso (hemorrágico) líquido livre ao redor.

7.6 ANEXO F - Família 6 – pacientes 9 e 10

Figura 28 - Heredograma da família 6, pacientes 9 e 10

Figura 29 – Mutação no *CYP17A1* éxon 6 (CGC/TGC) p.R362C em heterozigose e Mutação no éxon 7 (TGG/CGG) p.W406R em heterozigose

Figura 30 – Ultrassonografia pélvica mostrando ovário direito medindo 1,57x2,17x1,18 (Vol.: 2,1cm³); e ovário esquerdo medindo 1,63x1,7x2,11 (vol.: 3cm³) e útero: 26,5cm³.

7.7 ANEXO G - Família 7 – paciente 11

Figura 31 – Heredograma de família 7, paciente 11

Figura 32 - Mutação no *CYP17A1* éxon 7 (TGG/CGG) –p.W406R heterozigose da paciente 11

Figura 33 – Ultrassonografia pélvica da paciente 11 em que não foram visualizados os anexos.

7.8 ANEXO H - Família 8 – Pacientes 12 e 13

Figura 34 – Heredograma família 8, pacientes 12 e 13

Figura 35 – Mutação no *CYP17A1* (TGG/CGG) p.W406R no éxon 7 em homozigose

Figura 36 – Ultrassonografia pélvica da paciente 12 em que não foram visualizados os anexos; útero volume: 54cm³ (pós-tratamento).

Figura 37 – Ultrassonografia pélvica da paciente 13 em que não foram visualizados os anexos; útero volume: 70cm³ (pós-tratamento).

7.9 ANEXO I - Família 9 - paciente 14

Figura 38 – Heredograma da família 9, paciente 14

Figura 39 – Representação no site de predição “PolyPhen-2” da nova mutação encontrada no *CYP17A1* (p.G478S) evidenciando 100% de efeito deletério na proteína.

Figura 40 – Representação no site de predição “Sift Prediction” da nova mutação encontrada (p.G478S) evidenciando efeito deletério na proteína.

Figura 41 – Ultrassonografia pélvica com anexos não visualizados pós-tratamento (obs.: em USG pré-tratamento, foi observado aumento ovariano bilateral com imagens císticas no interior, mas não obtivemos a imagem, apenas o laudo).

Figura 44 – Ultrassonografia da paciente 15 mostrando Ovário direito: 10,9x3,1x4,2=74,4cm³, com múltiplas imagens císticas anecoicas, a maior 6,1x4,8, e Ovário Esquerdo: não visualizado (foi retirado por cirurgia após rompimento).

7.11 ANEXO K - Família 11 - paciente 17

Figura 45 – Heredograma da família 11, paciente 17

Figura 46 - Mutação no *CYP17A1* (CGC>CAC) p.R362H no éxon 6

7.12 ANEXO L - Família 12 – paciente 18

Figura 48 – Heredograma da família 12, paciente 18

Figura 49 - Mutação no *CYP17A1* éxon 7 (CGT/CAT) – R416H

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Miller WL. Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology*. 2005;146(6):2544-50.
2. Lin D, Harikrishna JA, Moore CC, Jones KL, Miller WL. Missense mutation serine106----proline causes 17 alpha-hydroxylase deficiency. *J Biol Chem*. 1991;266(24):15992-8.
3. Biglieri EG, Herron MA, Brust N. 17-Hydroxylation deficiency in man. *J Clin Invest*. 1966;45(1):1946-54.
4. Auchus RJ. The genetics, pathophysiology, and management of human deficiencies of P450c17. *Endocrinol Metabol Clin North Am*. 2001;30(1):101-19.
5. Yanase T. 17 α -hydroxylase/17,20-lyase defects. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995;53(1-6):153-7.
6. Yanase T, Simpson ER, Watwrman MR. 17Alpha-hydroxylase/17,20-lyase deficiency: from clinical investigation to molecular definition. *Endocr Rev*. 1991;12(1): 91-108.
7. Chung BC, Picado-Leonard J, Haniu M, Bienkowski M, Hall PF, Shively JE, Miller WL. Cytochrome P450c17 (steroid 17 alpha-hydroxylase/17,20 lyase): cloning of human adrenal and testis cdnas indicates the same gene is expressed in both tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(2):407-11.
8. Schonemann MD, Muench MO, Tee MK, Miller WL, Mellon SH. Expression of P450c17 in the human fetal nervous system. *Endocrinology*, 2012;153(5):2494-505.
9. Nakajin S, Shively JE, Yuan PM, Hall PT. Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis: two enzymic activities (17.alpha.-hydroxalase and C17,20 associated with one protein. *Biochemistry*. 1981;20(14):4037-42.
10. Picado-Leonard J, Miller WL. Cloning and sequence of the human gene for P450c17 (steroid 17-hydroxylase/17,20 lyase): similarity with the gene for P450c21. *DNA*. 1987;6(5):439-48.
11. Belgini DRB, Mello MP, Baptista MT, Oliveira DM, Denardi FC, Garmes HM, Grassiotto Oda R, Benetti Pinto CL, Marques-De-Faria AP, Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G. Six new cases confirm the clinical molecular profile of complete combined 17 $\pm$ -hydroxylase/ 17,20-lyase deficiency in Brazil. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2010;54:711-6.

12. Costa-Santos M, Kater CE, Auchus RJ, Two prevalent cyp17 mutations and genotype-phenotype correlations in 24 brazilian patients with 17-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2004;89(1):49-60.
13. Martin RM, Lin CJ, Costa EM, De Oliveira ML, Carrilho A, Villar H, Longui CA, Mendonca BB. P450c17 deficiency in brazilian patients: biochemical diagnosis through progesterone levels confirmed by cyp17 genotyping. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2003;88(12):5739-46.
14. Martin RM, Oliveira PSL, Costa EMF, Arnhold IJP, Mendonça BB. Combined 17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase deficiency due to a homozygous 25 Bp duplication (Nt 4157-4181) at exon 5 in the cyp17 resulting in a premature stop codon predicted by molecular modeling. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52:1317-20.
15. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev.* 2011;32(1):81-151.
16. Tian Q, Zhang Y, Lu Z, Partial 17alpha-hydroxylase/17,20-lyase deficiency-clinical report of five Chinese 46,Xx cases. *Gynecol Endocrinol.* 2008;24(7):362-7.
17. Yang J, Cui B, Sun S, Shi T, Zheng S, Bi Y, Liu J, Zhao Y, Chen J, Ning G, Li X. Phenotype-genotype correlation in eight Chinese 17 α -hydroxylase/17,20 lyase-deficiency patients with five novel mutations of cyp17a1 gene. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2006;91(9):3619-25.
18. Pandey AV, Miller WL. Regulation of 17,20 lyase activity by cytochrome B5 and by serine phosphorylation of P450c17. *J Biol Chem.* 2005;280(14):13265-71.
19. Miller WL, Pandey AV, Flück CE, Agrawal V. P450 oxidoreductase deficiency: a new disorder of steroidogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1061: 100-8.
20. Krone N, Arlt W. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Prac Res Clin Endocrinol Metabol.* 2009;23(2):181-92.
21. Miller WL, Agrawal V, Sandee D, Tee MK, Huang N, Choi JH, Morrissey K, Giacomini KM. Consequences of por mutations and polymorphisms. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;336(1–2):174-9.
22. Auchus RJ, Lee TC, Miller WL. Cytochrome B5 augments the 17,20-lyase activity of human p450c17 without direct electron transfer. *J Biol Chem.* 1998;273(6):3158-65.

23. Lee-Robichaud P, Shyadehi AZ, Wright JN, Akhtar ME, Akhtar M. Mechanistic Kinship between hydroxylation and desaturation reactions: acyl-carbon bond cleavage promoted by pig and human cyp17 (p-450(17)alpha; 17 alpha-hydroxylase-17,20-lyase). *Biochemistry*. 1995;34(43):14104-13.
24. Hackett CS, Strittmatter P. Covalent cross-linking of the active sites of vesicle-bound cytochrome B5 and nadh-cytochrome B5 reductase. *J Biol Chem*. 1984;259(5):3275-82.
25. Miller WL. The syndrome of 17,20 lyase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(1):59-67.
26. Kagimoto M, Winter JS, Kagimoto K, Simpson ER, Waterman MR. Structural characterization of normal and mutant human steroid 17 α -hydroxylase genes: molecular basis of one example of combined 17 α -hydroxylase/17,20 lyase deficiency. *Mol Endocrinol*, 1988;2(6):564-70.
27. Monte O, Caliari LE, Kochi C, Longui CA. Síndromes de hipertensão mineralocorticoide. In: Caliari LE, Kochi C, Longui CA, Monte O. *Endocrinologia para o pediatra*. 3 Ed. 2009, São Paulo: Atheneu.
28. Antley RM, Uga N, Burzynski Nj, Baum Rs, Bixler D. Diagnostic criteria for the whistling face syndrome. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1975;11(5):161-8.
29. Idkowiak J, O'Riordan S, Reisch N, Malunowicz EM, Collins F, Kerstens MN, Köhler B, Graul-Neumann LM, Szarras-Czapnik M, Dattani M, Silink M, Shackleton CH, Maiter D, Krone N, Arlt W. Pubertal presentation in seven patients with congenital adrenal hyperplasia due to P450 oxidoreductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metabol*. 2011;96(3):E453-62.
30. Bradley JP, Longaker MT, Habal MB. The IXth International Congress, International Society Of Craniofacial Surgery, Visby, Gotland, Sweden, June 2001. *J Craniofac Surg*. 2002.13(1):124-6.
31. Ten Kate-Booij MJ, Cobbaert C, Koper JW, De Jong FH. Deficiency of 17,20lyase causing giant ovarian cysts in a girl and a female phenotype in her 46,Xy Sister: case report. *Human Reprod*, 2004;19(2):456-9.
32. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
33. Rosa S, Duff C, Meyer M, Lang-Muritano M, Balercia G, Boscaro M, Topaloglu AK, Mioni R, Fallo F, Zuliani L, Mantero F, Schoenle EJ, Biason-Lauber A. P450c17 deficiency: clinical and molecular characterization of six patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(3):1000-7.

34. Sahakitrungruang T, Huang N, Tee MK, Agrawal V, Russell WE, Crock P, Murphy N, Migeon CJ, Miller WL. Clinical, genetic, and enzymatic characterization of P450 oxidoreductase deficiency in four patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(12):4992-5000.
35. Tian Q, Zhang Y, Lu Z. Molecular study of five chinese patients with 46xx partial 17 α -hydroxylase/17,20-lyase deficiency. *Gynecol Endocrinol.* 2012;28(3):234-8.
36. Marsh CA, Auchus RJ. Fertility In patients with genetic deficiencies of cytochrome P450c17 (Cyp17a1): combined 17-hydroxylase/17,20-lyase deficiency and isolated 17,20-lyase deficiency. *Fertil Steril.* 2014.101(2):317-22.
37. Wang J, Bissada MA, Williamson HO, Yakout H, Bissada NK. Adrenal tumors associated with inadequately treated congenital adrenal hyperplasia. *Can J Urol.* 2002;9(3):1563-4.
38. Huang N, Pandey AV, Agrawal V, Reardon W, Lapunzina PD, Mowat D, Jabs EW, Van Vliet G, Sack J, Flück CE, Miller WL. Diversity and function of mutations in P450 oxidoreductase in patients with antley-bixler syndrome and disordered steroidogenesis. *Am J Hum Genet.* 2005;76(5):729-49.
39. Gröndahl C, Hansen TH, Marky-Nielsen K, Ottesen JL, Hyttel P. Human oocyte maturation in vitro is stimulated by meiosis-activating sterol. *Human Reproduction.* 2000;15(Suppl 5): 3-10.
40. Wang C, Xu B, Zhou B, Zhang C, Yang J, Ouyang H, Ning G, Zhang M, Shen J, Xia G. Reducing Cyp51 inhibits follicle-stimulating hormone induced resumption of mouse oocyte meiosis in vitro. *J Lipid Res.* 2009;50(11):2164-72.
41. Rossmanith WG. Ultradian and circadian patterns in luteinizing hormone secretion during reproductive life in women. *Hum Reprod.* 1993;8(Suppl 2):77-83.