

# Editorial

## Caros Colegas

A Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo pretende ser o espelho da Endocrinologia Portuguesa, local para os sócios da SPEDM apresentarem os seus trabalhos de investigação, as suas casuísticas, os casos clínicos mais interessantes, pela sua raridade ou por alguma característica digna de nota, local para os grupos de estudo apresentarem os seus projectos e as suas actividades, os resultados das suas iniciativas e trabalhos.

Mas pretende ser também a revista de eleição para a publicação na área de endocrinologia por todos os colegas das outras áreas. Ficamos por isso muito satisfeitos por aumentarem os artigos publicados por médicos de outras especialidades, como é o caso do presente número que inclui trabalhos dos colegas de Medicina Interna do Hospital de Leiria e de Investigadores da Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa.

Queremos agradecer a todos os colegas pelos trabalhos que são enviados cada vez em maior número e de forma muito especial aos revisores que de forma generosa dão o seu tempo na avaliação cuidada dos artigos enviados e cujos comentários são de uma importância extrema para assegurar a qualidade da revista.

E neste trabalho de equipa todos lucrámos imenso, os autores ao verem os seus trabalhos comentados com sugestões de aperfeiçoamento, os revisores com o próprio trabalho de edição, que obriga a um grande cuidado de actualização e os leitores a quem a revista é dirigida e que têm assim a possibilidade de referir trabalhos de língua portuguesa e de autores portugueses nos seus próprios trabalhos.

Um pedido muito especial para o envio de trabalhos originais e de casuísticas. É obrigação de todos nós apresentarmos os resultados da nossa actividade, pois só desse modo poderemos comparar os nossos resultados com os de outros centros, com o objectivo de pugnar pela excelência.

A análise de resultados com o objectivo da identificação e correcção de problemas deverá ser uma actividade constante, mas só com a publicação desses resultados se poderão comparar estratégias e identificar formas de optimizar os resultados.

Por outro lado a pessoa doente deverá ter possibilidade de acesso aos resultados dos vários centros. É um direito que lhe assiste e que nós médicos devemos facultar.

Numa altura de contenção de custos convidamos todos os colegas à publicação de protocolos que assegurem a qualidade do diagnóstico e tratamento em que as soluções custo eficazes sejam preferidas sem colocar em risco a qualidade dos serviços. O objectivo deverá ser conseguir a maior rentabilização, fornecendo os melhores serviços possíveis sem desperdícios, com o objectivo de se atingir o melhor nível de cuidados para toda a população. A publicação de soluções custo-eficazes é neste momento uma prioridade para a RPEDM.

Pelo Corpo Editorial da RPEDM  
A Editora da RPEDM



M. Helena Cardoso

# Auto-imunidade tiroideia e infertilidade em mulheres submetidas a técnicas de reprodução medicamente assistida

## *Thyroid autoimmunity and infertility in women undergoing assisted reproductive techniques*

Marta Alves<sup>1</sup>, Celestino Neves<sup>1</sup>, Sandra Soares<sup>2</sup>, Ana Margarida Póvoa<sup>2</sup>, Lucinda Calejo<sup>2</sup>, Pedro Xavier<sup>2</sup>, Maria José Madureira<sup>2</sup>, Cláudia Coelho<sup>2</sup>, Renata Leite<sup>2</sup>, Andreia Carvalho<sup>2</sup>, David Stevenson<sup>2</sup>, Miguel Pereira<sup>1</sup>, Davide Carvalho<sup>1</sup>, Sónia Sousa<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Hospital de São João, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto

<sup>2</sup> Unidade de Medicina da Reprodução, Serviço de Ginecologia, Hospital de São João, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto

Correspondência: Marta Alves › Serviço de Endocrinologia › Hospital de São João › Alameda Prof. Hernâni Monteiro › 4200-319 PORTO › marta.mfa@gmail.com

### RESUMO

**Introdução:** Alguns estudos mostram que a taxa de gravidez é significativamente menor em mulheres com anticorpos anti-tiroideus positivos, sugerindo interferência da autoimunidade tiroideia com a implantação. Outros estudos negam esta associação. **Objectivo:** Comparar o sucesso (gravidez clínica) de diferentes técnicas de reprodução medicamente assistida (RMA) em mulheres com anticorpos anti-tiroideus positivos e negativos. **Material e Métodos:** Analisaram-se os dados de 235 mulheres candidatas à realização de técnicas de RMA (ICSI – microinjecção intracitoplasmática, FIV – Fertilização in vitro, DGPI – diagnóstico genético pré-implantatório, ou IIU – inseminação intrauterina) ao longo de 7 meses. Os doseamentos de TSH, T4L, T3L, anti-TPO e anti-Tg foram realizados previamente ao início do tratamento. Conseguiram-se ciclos completos em 195 mulheres (ICSI - 125, FIV - 31, IIU – 22, DGPI – 17). Os resultados são expressos em média±DP (mín-máx) e em percentagem. Fez-se ainda análise estatística com o teste de correlação de Pearson e Spearman; os resultados com valor de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. **Resultados:** A maioria apresenta TSH normal (96,9%) e 92,8% apresentam TSH  $< 2,5 \mu\text{UI/mL}$ . Os anticorpos anti-TPO foram positivos em 14,8% e os anti-Tg em 23,6% da amostra total. A taxa de gravidez clínica global foi de 37,4%. Este valor foi maior para a ICSI (44%), seguido da FIV (35,5%), DGPI (23,5%) e IIU (13,6%). Verificou-se uma menor percentagem de gravidez clínica entre as mulheres “anti-TPO+”, comparativamente às “anti-TPO+ e/ou anti-Tg+” e sem TAI (“anti-TPO- e anti-Tg-”). Esta diferença, observada quando se usam apenas os anti-TPO para definir TAI, dilui-se quando se comparam os grupos “sem TAI” e “anti-TPO e/ou anti-Tg positivo”. Contudo, aplicando o teste de correlação de Spearman, não se verificou significância estatística no que concerne à influência da positividade ou negatividade dos anticorpos “anti-TPO” e dos “anti-TPO e/ou anti-Tg” na obtenção de gravidez clínica. **Conclusões:** Apesar de os resultados não serem estatisticamente significativos, facto para o qual poderá contribuir o reduzido número mulheres com anticorpos positivos e o reduzido número de gravidezes clínicas nestas mulheres, a percentagem de gravidez clínica parece ser afectada pela positividade para anticorpos anti-TPO. No entanto, esta influência dilui-se quando os anticorpos anti-Tg também são utilizados para definir TAI. Estes resultados permitem-nos supor que qualquer

possível interferência com a possibilidade de engravidar possa estar, fundamentalmente, na dependência da influência directa ou indirecta dos anticorpos anti-TPO.

#### PALAVRAS-CHAVE

Reprodução medicamente assistida; Auto-imunidade; Tiróide.

#### ABSTRACT

*Introduction: Some studies show that pregnancy rate is significantly lower in women with positive anti-thyroid antibodies, suggesting interference of thyroid autoimmunity with embryo implantation. Other studies deny this association. Objective: To compare the success (clinical pregnancy) of different assisted reproductive technologies (ART) in women with positive and negative anti-thyroid antibodies. Material and Methods: We analyzed data from 235 women candidates for the realization of ART (ICSI - intracytoplasmic microinjection, IVF - in vitro fertilization, PGD - Preimplantation genetic diagnosis, or IUI - intrauterine insemination) over 7 months. Determination of TSH, FT4, FT3, anti-TPO and anti-Tg was performed prior to initiation of treatment. Completed cycles occurred in 195 women (ICSI - 125, IVF - 31, IUI - 22, PGD - 17). Results are expressed as mean  $\pm$  SD (min-max) and percentage. Statistical analysis with the Pearson correlation test and Spearman were done; results with  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Results: The majority had normal TSH (96.9%) and 92.8% had TSH  $< 2.5 \mu\text{UI} / \text{mL}$ . Anti-TPO antibodies were positive in 14.8% and anti-Tg antibodies in 23.6% of the total sample. The overall clinical pregnancy rate was 37.4%. This value was higher for ICSI (44%), followed by IVF (35.5%), PGD (23.5%) and IUI (13.6%). There was a lower percentage of clinical pregnancy in women "anti-TPO +" compared to "anti-TPO + and / or anti-Tg +" and without AIT. This difference, observed when using only the anti-TPO to set AIT, is diluted when comparing the groups "without AIT" and "anti-TPO+ and/or anti-Tg+". However, applying the Spearman correlation test, there was no statistical significance regarding the influence of antibody positivity or negativity of "anti-TPO" and "anti-TPO and/or anti-Tg" in achieving clinical pregnancy. Conclusions: Although results were not statistically significant, a fact which may be related to the low number of women with positive antibodies and the small number of clinical pregnancies in these women, the clinical pregnancy rate seems to be affected by positivity for anti-TPO antibodies. However, this influence is diluted when the anti-Tg antibodies are also used to define AIT. These results allow us to assume that any possible interference with the ability to become pregnant may be fundamentally dependent on the direct or indirect influence of anti-TPO antibodies.*

#### KEYWORDS

Assisted reproductive technologies; Autoimmunity; Thyroid.

## INTRODUÇÃO

A doença auto-imune da tiróide apresenta uma prevalência entre 5 a 15% e representa o distúrbio endócrino mais frequente em mulheres em idade reprodutiva. A presença de anticorpos anti-tiroideus circulantes constitui um marcador de tiroidite auto-imune (TAI), também designada de

tiroidite de Hashimoto. É a doença auto-imune específica de órgão mais frequente<sup>1,2</sup>.

Os anticorpos anti-tireoperoxidase (anti-TPO) são mais sensíveis que os anti-tireoglobulina (anti-Tg) para o diagnóstico de doença auto-imune da tiróide, sendo considerados o principal marcador diagnóstico para a identificação de auto-imunidade tiroideia<sup>3,4</sup>. De facto, em doentes com TAI os

doseamentos de anti-Tg são menos vezes positivos relativamente aos de anti-TPO. No entanto, em alguns casos, soros anti-Tg positivos podem ser negativos para anti-TPO. Portanto, a determinação conjunta de ambos os tipos de anticorpos anti-tiroideus constitui uma forma mais sensível de diagnóstico de auto-imunidade tiroideia<sup>3</sup>.

A disfunção tiroideia e a positividade para anticorpos anti-tiroideus aumentam, de forma independente, o risco de infertilidade e de abortamento. Durante o primeiro trimestre, a mulher com TAI apresenta um maior risco de abortamento comparativamente a mulheres sem TAI, mesmo quando eutiroideias<sup>5</sup>.

Nas mulheres inférteis, a prevalência de auto-imunidade tiroideia é significativamente elevada relativamente aos controlos, especialmente se existir endometriose e disfunção ovárica, sobretudo síndrome do ovário poliquístico<sup>5,6</sup>. De facto, os níveis de T3 modulam a acção das gonadotropinas (FSH e LH) na biosíntese esteróide e vários locais de ligação da T3 foram identificados em células estromais e da granulosa de mamíferos e em ovócitos humanos<sup>7</sup>. A disfunção tiroideia, por si só, interfere com o normal funcionamento ovárico e é mais frequente em mulheres com anti-TPO positivos<sup>6</sup>.

Foi ainda demonstrado que a hiperestimulação ovárica controlada na preparação para a Reprodução Medicamente Assistida (RMA) tem um impacto significativo na função tiroideia, particularmente na presença de TAI<sup>5</sup>. Em mulheres sem TAI estas alterações são transitórias, mas naquelas com evidência de auto-imunidade, a estimulação estrogénica pode levar a alterações da função tiroideia que se prolongam durante toda a restante gravidez<sup>8</sup>. Por estes motivos é recomendada a aferição da função tiroideia e dos níveis de anticorpos anti-tiroideus em mulheres inférteis, antes da aplicação de técnicas de RMA, e o seguimento destes parâmetros durante a gravidez nos casos de auto-imunidade positiva<sup>5</sup>.

A taxa de gravidez de mulheres subme-

tidas a técnicas de RMA parece ser significativamente menor em mulheres com positividade para auto-anticorpos órgão-específicos, tais como os anti-tiroideus e os anti-ovário<sup>9</sup>. Há, contudo, também, estudos que mostram taxas de gravidez comparáveis em mulheres com e sem TAI submetidas a técnicas de RMA, sugerindo não existir interferência da auto-imunidade com a implantação<sup>8,10-12</sup>.

A interpretação dos dados disponíveis é difícil por várias razões, entre as quais se incluem a heterogeneidade das amostras estudadas, o facto de muitos estudos não serem controlados, serem retrospectivos e as amostras serem insuficientes. As diferenças resultantes da utilização de diferentes métodos para a detecção de anticorpos anti-tiroideus e, finalmente, as diferenças geográficas da disponibilidade e aporte de iodo também dificultam esta interpretação<sup>2</sup>.

Os mecanismos subjacentes à interferência dos anticorpos anti-tiroideus na gravidez não estão esclarecidos, mas foram colocadas 3 hipóteses: (i) os abortamentos em mulheres com anticorpos anti-tiroideus positivos podem dever-se a défices subtis dos níveis de hormonas tiroideias; (ii) podem existir efeitos directos dos anticorpos anti-tiroideus na placenta; (iii) estes anticorpos podem ser marcadores de um estado imunitário alterado, responsável por uma implantação instável do embrião<sup>13</sup>. À semelhança, as questões levantadas relativamente aos anticorpos anti-tiroideus em mulheres que se submetem a técnicas de RMA são (i) se estes constituem apenas um marcador de auto-imunidade; (ii) se são directamente responsáveis por redução das taxas de gravidez/natalidade; ou (iii) se constituem um sinal indirecto de ligeira disfunção tiroideia<sup>14</sup>.

## OBJECTIVO

O objectivo do nosso estudo é determinar se mulheres com tiroidite auto-imune

(anticorpos anti-tiroideus positivos) submetidas a tratamentos de RMA apresentam menores taxas de sucesso do que as que não têm anticorpos anti-tiroideus positivos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Ao longo de 7 meses (Março a Outubro de 2010), na Unidade de Medicina da Reprodução do Hospital de São João, 235 mulheres foram seleccionadas para diferentes técnicas de RMA [ICSI (injecção intracitoplasmática), FIV (fertilização in vitro), IIU (inseminação intra-uterina) e DGPI (diagnóstico genético pré-implantatório)]. Foram colhidas amostras de sangue para doseamento de tireotrofina (TSH), T4 livre (T4L), T3 livre (T3L), anti-TPO e anti-Tg antes do início do tratamento.

Os parâmetros de referência laboratorial são: TSH - 0,35 a 4,94 $\mu$ UI/mL, T4L - 0,7 a 1,48ng/dL, T3L - 1,71 a 3,71 pg/mL, anti-Tg <4,11UI/mL, anti-TPO <5,61UI/mL. Os doseamentos foram feitos por quimioluminescência.

Foram excluídos os casos em que os ciclos foram cancelados por inadequada estimulação ovárica, os casos em que os embriões não cumpriam critérios de qualidade para transferência e outras situações em que não se concretizou a transferência de embriões.

Foi iniciada terapêutica com levotiroxina nas mulheres com alterações da função

tiroideia de modo a se obterem níveis de TSH entre 1,5 e 2,5 $\mu$ UI/mL.

Foram avaliados os resultados (presença ou ausência de gravidez clínica) das diferentes técnicas de RMA nas mulheres com anti-tiroideus positivos vs negativos.

A análise estatística foi efectuada com o teste t-Student e com o teste de Fisher. Os resultados são expressos em média $\pm$ DP (mín-máx) e em percentagem. Os resultados com valor de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## RESULTADOS

Na tabela I estão representadas as idades das mulheres submetidas às técnicas de RMA. A média de idades é mais elevada no grupo ICSI e menor no grupo IIU, com uma diferença estatisticamente significativa (34,35 $\pm$ 4,07 vs 31,63 $\pm$ 3,77 anos;  $p = 0,005$ ).

TABELA I: Idades (anos) por técnica de RMA

	Média $\pm$ DP (mín-máx)
ICSI	34,35 $\pm$ 4,07 (24-42)
FIV	33,94 $\pm$ 4,05 (24-41)
IIU	31,63 $\pm$ 3,77 (23-37)
DGPI	33,41 $\pm$ 3,57 (24-40)

Na tabela II estão representados os parâmetros analíticos, relativamente à função tiroideia e os níveis de anticorpos anti-tiroideus.

TABELA II: Características analíticas da amostra. Os dados são expressos em média $\pm$ DP (mínimo-máximo).

	TSH ( $\mu$ UI/mL)	T4L (ng/dL)	T3L (pg/mL)	Anti-TPO (UI/mL)	Anti-Tg (UI/mL)
DGPI	1,54 $\pm$ 0,77 (0,44-3,31)	1,24 $\pm$ 0,17 (1,01-1,63)	3,01 $\pm$ 0,44 (2,3-3,79)	65,6 $\pm$ 241,8 (0-1000)	88,12 $\pm$ 199,97 (0,4-587,3)
FIV	1,33 $\pm$ 0,67 (0,48-2,52)	1,23 $\pm$ 0,16 (0,99-1,63)	2,96 $\pm$ 0,32 (2,44-3,64)	83,11 $\pm$ 196,02 (0-1000)	51,96 $\pm$ 180,43 (0,7-969,8)
ICSI	1,38 $\pm$ 1,37 (0,05-13,73)	1,26 $\pm$ 0,15 (0,94-1,85)	3,14 $\pm$ 0,46 (1,94-4,43)	33,82 $\pm$ 148,43 (0-1000)	10,43 $\pm$ 34,37 (0,4-243,8)
IIU	1,36 $\pm$ 0,51 (0,77-2,71)	1,16 $\pm$ 0,11 (0,96-1,36)	2,67 $\pm$ 0,48 (1,77-3,54)	38,74 $\pm$ 149,97 (0-694)	77,87 $\pm$ 231,61 (0,4-1000)

Na maioria das mulheres (96,9%) os níveis de TSH eram normais, sendo elevados em 2 e baixos em 4 mulheres submetidas a poliovulação controlada para ICSI. Estes 6 valores alterados de TSH, no grupo ICSI (6/126), foram os seguintes: 13,73 $\mu$ UI/mL (T4L 1,12ng/dL; anti-Tg+); 6,34 $\mu$ UI/mL (T4L 1,33ng/dL; anti-TPO+); 0,31 $\mu$ UI/mL (T4L 1,23ng/dL; anti-Tg+); 0,27 $\mu$ UI/mL (T4L 1,33ng/dL; anti-Tg+); 0,17 $\mu$ UI/mL (T4L 1,48ng/dL; anti-Tg+); 0,05 $\mu$ UI/mL (T4L 1,85ng/dL; anti-Tg+). Todas as mulheres com hipotireoidismo subclínico e a mulher com hipertireoidismo clínico foram tratadas previamente à realização da técnica de RMA. Apresentavam TSH inferior a 2,5 $\mu$ UI/mL, 92,8% das mulheres da amostra. O valor médio de TSH foi mais elevado no grupo DGPI [1,54 $\pm$ 0,77 (0,44-3,31)]; no entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores de TSH dos diferentes grupos.

Na tabela III mostram-se o número de ciclos realizados, o número de ciclos cancelados e o número de ciclos completados (transferência de embriões para ICSI, FIV e DGPI) para cada técnica.

As taxas de sucesso das diferentes técnicas de RMA descrevem-se na tabela IV. Os resultados apresentados respeitam unica-

TABELA III: Número de ciclos realizados

	Nº ciclos total	Cancelados	Completados
ICSI	147	22	125
FIV	35	4	31
IIU	27	5	22
DGPI	26	9	17
Totals	235	40	195

TABELA IV: Taxas de sucesso das técnicas de RMA

	Ciclos (N)	Gravidez clínica (N)	Gravidez clínica (%)
ICSI	125	55	44
FIV	31	11	35,5
IIU	22	3	13,6
DGPI	17	4	23,5
Totals	195	73	37,4

mente aos ciclos completados. A taxa de gravidez clínica global foi de 37,4%.

Considerando como critério de diagnóstico de tireoidite auto-imune, a positividade para anticorpos “anti-TPO e/ou anti-Tg” temos uma frequência de doença auto-imune de 27,2% e de apenas 14,8% quando apenas se considera a positividade para anticorpos anti-TPO (tabela V).

Na tabela VI estão representadas as taxas de sucesso das técnicas de RMA, com as respectivas taxas de gravidez clínica observadas nos diferentes grupos de técnicas de RMA.

TABELA V: Frequência de anticorpos anti-tiroideus positivos por técnica de RMA

	Ciclos (N)	Anti-TPO+ e/ou Anti-Tg+ (N/%)	Anti-TPO+ (N/%)	Anti-Tg+ (N/%)
ICSI	125	32	14	29
FIV	31	12	10	8
IIU	22	6	2	6
DGPI	17	3	3	3
Totals	195	53/27,2	29/14,8	46/23,6

TABELA VI: Gravidez clínica em função dos doseamentos de anticorpos anti-tiroideus

	Anti-TPO- e anti-Tg- (%)	Anti-TPO+ e/ou anti-Tg+ (%)	Anti-TPO+ (%)	Anti-TPO- (%)
ICSI	43	46,9	35,7	45
FIV	36,8	33,3	30	38,1
IIU	18,8	0	0	15
DGPI	28,6	0	0	28,6

Verificou-se uma menor frequência de gravidez nas mulheres “anti-TPO+”, comparativamente às “anti-TPO-”, em todos os grupos de tratamento. De notar, ainda, uma menor percentagem de gravidez clínica entre as mulheres “anti-TPO+”, comparativamente às “anti-TPO+ e/ou anti-Tg+”. Nos diferentes grupos de tratamentos, a percentagem de gravidez clínica nas mulheres “anti-TPO+” foi também inferior à obtida em mulheres sem TAI, “anti-TPO- e anti-Tg-”.

Esta diferença, observada quando se usam apenas os anticorpos anti-TPO para diagnosticar TAI, dilui-se quando se comparam os grupos “anti-TPO- e/ou anti-Tg-” e “anti-TPO+ e/ou anti-Tg+”.

No entanto, aplicando o teste de correlação de Spearman, não se verificou significância estatística no que concerne à influência da positividade ou negatividade dos anticorpos anti-TPO para a obtenção de gravidez clínica [(ICSI  $r = -0,04$ ,  $p = 0,65$ ; FIV  $r = -0,07$ ,  $p = 0,67$ ; IIU  $r = -0,12$ ,  $p = 0,57$ , DGPI  $r = -0,25$ ;  $p = 0,32$ ]. De igual modo, também não se verificou a existência de correlação entre a positividade e a negatividade dos anticorpos “Anti-TPO e/ou Anti-TG” e o sucesso da gravidez [(ICSI  $r = 0,04$ ,  $p = 0,60$ ; FIV  $r = -0,03$ ,  $p = 0,84$ ; IIU  $r = -0,24$ ,  $p = 0,27$ ; DGPI  $r = -0,25$ ,  $p = 0,32$ ].

## DISCUSSÃO

A taxa de gravidez clínica foi superior para a ICSI (44%), seguida da FIV (35,5%), DGPI (23,5%) e IIU (13,6%). Na literatura, a FIV é habitualmente a técnica que apresenta maior taxa de gravidez (40%), seguida da ICSI (30-35%), DGPI (20%) e IIU (10%). Obteve-se maior sucesso com a ICSI e menor com a FIV, facto que se pode dever ao reduzido número da amostra, especialmente do grupo submetido a FIV.

A média de idades foi mais elevada no grupo ICSI e menor no grupo IIU, com significado estatisticamente significativo. Este facto é expectável pelas diferentes indica-

ções dos tratamentos.

A maioria das mulheres (96,9%) apresentava TSH normal, e em 92,8% o valor de TSH era adequado para engravidar (1,5-2,5 $\mu$ UI/mL). O valor médio de TSH foi mais elevado no grupo DGPI; no entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Apesar de se incluírem duas situações com TSH elevado (13,73 $\mu$ UI/mL; 6,34 $\mu$ UI/mL) ambas foram corrigidas antes do início da técnica de RMA. Quanto aos valores de TSH diminuído, três casos dizem respeito a situações subclínicas (0,31 $\mu$ UI/mL; 0,27 $\mu$ UI/mL; 0,17 $\mu$ UI/mL) e num outro, a TSH era de 0,05 $\mu$ UI/mL (T4L 1,85ng/dL). Este caso de hipertireoidismo clínico foi tratado previamente à realização de ICSI, tendo-se verificado a gravidez clínica.

Entre as mulheres com TSH alterada, de notar que em 3 mulheres com TSH inferior ao limite da normalidade e numa com TSH elevado, os níveis de anti-Tg, mas não os de anti-TPO, estavam alterados. Ao contrário da maioria dos dados da literatura, verificou-se, nesta amostra, uma frequência superior de anticorpos anti-Tg positivos, relativamente à positividade dos anticorpos anti-TPO<sup>16,17</sup>.

Contudo, é importante relembrar que não são conhecidas acções biológicas concretas para os anti-Tg, pensando-se que não tenham uma acção patogénica. Esta informação é apoiada pela presença de níveis elevados de anti-Tg em indivíduos normais, em doentes com gamapatia monoclonal, bem como pela ausência de correlação entre as concentrações de anti-Tg e a actividade da doença em doentes com TAI<sup>4</sup>. Múltiplas configurações antigénicas da tireoglobulina são produzidas com a sua iodação, resultando em moléculas funcionalmente activas, mas imunologicamente distintas<sup>3</sup>. A importância patogénica dos anti-TPO é também pouco conhecida, mas a evidência, em comparação com os anti-Tg, é claramente superior. Os níveis séricos destes anticorpos correlacionam-se com a fase activa da doença em doentes com TAI e

estudos *in vitro* mostram capacidade de fixação do complemento e de ligação aos tireócitos, promovendo a sua destruição e o desenvolvimento de hipotiroidismo, ocorrendo uma perda gradual da função tiroideia de 5% por ano. Os efeitos desta disfunção tiroideia na evolução da gravidez são bem conhecidos e foram já referidos<sup>15,18-20</sup>.

Neste contexto, é importante salientar que muitos trabalhos têm em consideração apenas a positividade para anti-TPO. Tendo em conta este facto e as informações descritas no parágrafo anterior, sobretudo a maior especificidade dos anticorpos anti-TPO no que respeita ao diagnóstico de TAI, fez-se uma avaliação independente dos dados para estes anticorpos.

Quando se comparam as percentagens de gravidez clínica nos diferentes procedimentos de acordo com a presença ou ausência de anticorpos anti-tiroideus, e anti-TPO em particular, verificam-se percentagens semelhantes nos grupos sem TAI (“anti-TPO e anti-Tg não reactivos”) e “anti-TPO não reactivo” isolado e percentagens muito diferentes entre os grupos sem TAI (“anti-TPO e anti-Tg não reactivos”) e “anti-TPO+”, tendo sido mais baixas no último grupo. Verificou-se, ainda, uma menor percentagem de gravidez clínica nos grupos ICSI e FIV entre as mulheres “anti-TPO+”, comparativamente às “anti-TPO+ e/ou anti-Tg+”. Esta diferença, observada quando se usam apenas os anti-TPO para definir TAI, dilui-se quando se comparam os grupos sem TAI (“anti-TPO e anti-Tg não reactivos”) e “anti-TPO+ e/ou anti-Tg+”, que têm em consideração a positividade ou negatividade para os anticorpos anti-Tg. Estes resultados permitem-nos supor que qualquer possível interferência com a possibilidade de engravidar possa estar, fundamentalmente, na dependência da influência directa ou indirecta (marcador de auto-imunidade) dos anticorpos anti-TPO.

Os autores apontam como limitação deste trabalho o reduzido número de casos com anticorpos anti-tiroideus positivos, par-

ticularmente no que respeita às técnicas IIU e DGPI, o que não permite, nestes casos, tirar ilações. A existência de diferença estatisticamente significativa entre as idades de diferentes grupos constitui outra limitação do nosso estudo. Contudo, e apesar de as taxas de sucesso das diferentes técnicas também predizerem esta tendência, não deixa de ser curioso que a taxa de gravidez tenha sido tanto maior quanto maior a média de idades dos diferentes grupos, isto é, menor para a IIU, seguida da DGPI, FIV e ICSI.

## CONCLUSÕES

Este trabalho remete-nos para a problemática da auto-imunidade e infertilidade, cujos contornos persistem pouco esclarecidos. Apesar de os resultados não serem estatisticamente significativos, facto para o qual poderá contribuir o reduzido número de mulheres com anticorpos positivos e o reduzido número de gravidezes clínicas nestas mulheres, a percentagem de gravidez clínica parece ser afectada pela positividade para anticorpos anti-TPO. No entanto, esta influência dilui-se quando os anticorpos anti-Tg também são utilizados para definir TAI, observando-se, neste caso, taxas de gravidez semelhantes em mulheres com e sem TAI. Estes resultados permitem-nos supor que qualquer possível interferência com a possibilidade de engravidar possa estar, fundamentalmente, na dependência da influência directa ou indirecta (marcador de auto-imunidade) dos anticorpos anti-TPO.



## BIBLIOGRAFIA

1. Poppe K, Glinoyer D, Tournaye H, Devroey P, Schiettecatte J, Haentjens P, Velkeniers B 2007 Thyroid autoimmunity and female infertility. In: Wiersinga W, Drexhage H, Weetman A, Butz S, eds. *The thyroid and autoimmunity*. New York: Georg Thieme Verlag; 143–152.
2. Poppe K, Velkeniers B, Glinoyer D. Thyroid disease and female reproduction. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007; 66:309–321.
3. Sinclair D. Analytical aspects of thyroid antibodies estimation. *Autoimmunity* 2008; 41(1):46–54.
4. Werner, Ingbar, Braverman LE, et al. *Thyroid – a fundamental and clinical text*. 9th edition, Lippincott Williams&Wilkins, 2005.
5. Negro R, Formoso G, Coppola L, Presicce G, Mangieri T, Pezzarossa A, Dazzi D. Euthyroid women with autoimmune disease undergoing assisted reproduction technologies: The role of autoimmunity and thyroid function. *J Endocrinol Invest* 2007; 30:3–8.
6. Poppe K, Velkeniers B. Thyroid and infertility. *Verh K Acad Geneesk Belg*. 2002;64(6):389–99.
7. Wakim AN, Polizotto SL, Buffo MJ, Marrero MA, Burholt DR. Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. *Fertil Steril* 1993; 59:1187–1190.
8. Poppe K, Velkeniers B, Glinoyer D; Medscape. The role of thyroid autoimmunity in fertility and pregnancy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008 Jul;4:3 94–405.
9. Geva E, Vardinon N, Lessing JB, Lerner-Geva L, Azem F, Yovel I, Burke M, Yust I, Grunfeld R and Amit A. Organ-specific autoantibodies are possible markers for reproductive failure: a prospective study in an in vitro fertilization–embryo transfer programme. *Hum Reprod* 1996; 11, 1627–1631.
10. Kutteh WH, Schoolcraft WB and Scott RT. Antithyroid antibodies do not affect pregnancy outcome in women undergoing assisted reproduction. *Hum Reprod* 1999; 14:2886–2890.
11. Muller AF, Verhoeff A, Mantel MJ and Berghout A. Thyroid autoimmunity and abortion: a prospective study in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1999; 71:30–34.
12. Rushworth FH, Backos M, Rai R, Chilcott IT, Baxter N and Regan L. Prospective pregnancy outcome in untreated recurrent miscarriers with thyroid autoantibodies. *Hum Reprod* 2000; 15: 1637–1639.
13. Abramson J and Stagnaro-Green A. Thyroid antibodies and fetal loss: an evolving story. *Thyroid* 2001; 11: 57–63.
14. Negro R, Mangieri T, Coppola L, et al. Levothyroxine treatment in thyroid peroxidase antibody-positive women undergoing assisted reproduction technologies: a prospective study. *Human Reproduction* 2005; 20: 1529–1533.
15. Krassas GE, Poppe K, Glinoyer D. Thyroid Function and Human Reproductive Health. *Endocr Rev* 2010; 23:702–55.
16. Jorge Z, Nobre EL, Santana A, Jácome de Castro J. *Acta Med Port* 2005; 18: 88–92.
17. Viggianol D, Silvall N, Montandon II A, Barbosall V. Prevalência de doenças tireoidianas auto-imunes em pacientes com lúpus eritematoso sistémico. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008;52: 531–536.
18. Alves M, Neves C, Delgado L, Medina JL. Disfunção tiroideia na gravidez. *Rev Port End Diab Metab* 2007;2: 47–56.
19. Neves C, Alves M, Delgado L, Medina JL. Tireoidite Pós-Parto. *Acta Med Port* 2009; 22: 599–608.
20. Weiwei Wang, Weiping Teng, Zhongyan Shan, et al. The prevalence of thyroid disorders during early pregnancy in China: the benefits of universal screening in the first trimester of pregnancy. *Eur J Endocrinol* 2011; 164: 263–268.

# Comparação dos resultados do doseamento de hemoglobina A1c obtidos por sistemas portáteis com o método de referência

## *Comparison of results of hemoglobin A1c obtained by portable systems with the reference method*

Teresa Azevedo<sup>1</sup>, Sara Pinto<sup>2</sup>, José Carlos Oliveira<sup>3</sup>, Isabel Mangas Palma<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Interna de Formação Específica de Endocrinologia do Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo do Instituto Português de Oncologia de Coimbra.

<sup>2</sup> Enfermeira Graduada do Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo do Hospital de Santo António, Centro Hospitalar do Porto.

<sup>3</sup> Chefe de Serviço do Serviço de Química Clínica do Hospital de Santo António, Centro Hospitalar do Porto.

<sup>4</sup> Assistente Hospitalar do Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo do Hospital de Santo António, Centro Hospitalar do Porto.

Correspondência: Teresa Cristina Maia Ferreira Azevedo · Avenida Bissaya Barreto, n° 98 · 3000-075 COIMBRA · tcmfazevedo@gmail.com

### RESUMO

**Introdução:** A HbA1c é uma excelente ferramenta na avaliação do doente diabético. Existem disponíveis no mercado cada vez mais aparelhos portáteis de medição da HbA1c.

**Objectivo:** Comparar o resultado do doseamento de dois sistemas de análise de HbA1c portáteis: DCA2000 e Quo-Test com o método de referência.

**Tipo de Estudo:** Prospectivo.

**População:** Cinquenta e dois doentes da Consulta de Terapêutica Educacional da Diabetes do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Santo António.

**Métodos:** Colheita de sangue capilar para doseamento de HbA1c pelos sistemas DCA2000 e Quo-Test e de sangue venoso para doseamento laboratorial de HbA1c. Comparação entre os resultados de HbA1c obtidos por cada analisador portátil e o resultado laboratorial.

**Resultados:** Para valores laboratoriais de HbA1c ≤ 10%, encontrou-se uma correlação linear positiva e estatisticamente significativa entre os resultados obtidos pelos aparelhos portáteis e os valores laboratoriais: para DCA2000 e laboratório  $r=0,973$ ,  $p<0,001$ ; para Quo-Test e laboratório  $r=0,922$ ,  $p<0,001$ . Relativamente à concordância entre os resultados, a diferença entre os valores obtidos pelo sistema DCA2000 e o laboratório foi em média 0,044% inferior pelo método portátil, IC95%=[-0,128;0,041],  $p=0,304$ ; a diferença entre os valores obtidos pelo sistema Quo-Test e o laboratório foi em média 0,378% inferior pelo sistema portátil, IC95%=[-0,522;-0,235],  $p<0,001$  (viés sistemático). Para valores de HbA1c > 10%, a correlação encontrada entre os valores obtidos pelo sistema DCA2000 e os do laboratório não foi estatisticamente significativa ( $r=0,742$ ,  $p=0,091$ ), enquanto que o sistema Quo-Test forneceu resultados com correlação linear positiva e estatisticamente significativa com os do laboratório ( $r=0,987$ ,  $p<0,001$ ) tendo-se verificado concordância entre eles IC95%=[-0,318;0,351],  $p=0,903$ .

**Conclusões:** O objectivo dos equipamentos portáteis não é o de substituírem o laboratório, mas sim o de fornecerem uma resposta capaz e rápida, não dispensando a confirmação laboratorial com periodicidade adaptada à situação clínica, pelo que importa conhecer as características que os distinguem do método de referência. Os resultados do presente estudo sugerem que o equipamento baseado na técnica de imunoensaio (DCA2000) é mais fiável do que o equipamento baseado em metodologia de afinidade ao boronato (Quo-Test), excepto para os valores de HbA1c superiores a 10%.

### PALAVRAS-CHAVE

Diabetes mellitus; Hemoglobina glicada; HbA1c; Sistemas de análise portáteis.

**ABSTRACT**

**Introduction:** *HbA1c measurement is an excellent tool for the management of diabetic patients. There are many portable devices for measuring HbA1c.*

**Aim:** *To compare two portable devices for measuring HbA1c: DCA2000 and Quo-Test with the reference method.*

**Design:** *Prospective.*

**Population:** *Fifty-two diabetic patients of the Endocrinology Department of Santo António Hospital.*

**Methods:** *Finger-stick blood samples for measurement of HbA1c by DCA2000 and Quo-Test systems and venous blood sample for laboratory measurement of HbA1c were collect. The results obtained by each portable analyzer were compared individually with those reported by lab.*

**Results:** *For laboratory values of HbA1c ≤ 10%, we found a linear positive and statistically significant correlation between HbA1c values obtained by each of the portable devices and the laboratory values: for DCA2000 analyzer and lab  $r=0.973$ ,  $p < 0.001$ ; for Quo-Test analyzer and lab  $r=0.922$ ,  $p < 0.001$ . Regarding the agreement between the results: for DCA2000 analyzer, the difference between its values and those reported by lab was on average 0.044% HbA1c lower for the portable device, 95%CI=[-0.128; 0.041],  $p = 0.304$ ; for Quo-Test analyzer, the difference between its values and those reported by lab was on average 0.378% HbA1c lower for the portable device, 95% CI = [-0.522; -0.235],  $p < 0.001$  (systematic bias). For HbA1c > 10%, the correlation between HbA1c values obtained by DCA2000 and lab was not statistically significant ( $r=0.742$ ,  $p=0.091$ ), while the Quo-Test values had a linear positive and statistically significant correlation with the laboratory values ( $r=0.987$ ,  $p < 0.001$ ) and there was agreement between them 95%CI=[-0.318;0.351],  $p=0.903$ .*

**Conclusions:** *The purpose of portable equipment is not to replace the lab, but rather provide an able and quick answer, not leaving aside the laboratory confirmation with intervals adapted to the clinical situation and is important to know the characteristics that distinguish them from the reference method. The results of this study suggest that the equipment based on immunoassay technique (DCA2000) is more reliable than equipment based on methodology of affinity to boronate (Quo-Test), except for HbA1C values above 10%.*

**KEYWORDS**

*Diabetes mellitus; Glycated hemoglobin; HbA1c; Portable analyser systems.*

**INTRODUÇÃO**

A hemoglobina glicada, denominada de forma genérica por HbA1c ou A1c, foi identificada por Rahbar e colaboradores em 1960<sup>1</sup> e é usada na prática clínica desde a década de 1980 para avaliar o controlo glicémico dos doentes diabéticos<sup>2</sup>. A hemoglobina A (HbA) é a principal forma de hemoglobina (Hb), englobando a HbA<sub>0</sub> (principal componente; fracção não-glicada) e a HbA<sub>1</sub> (fracção glicada). Existem três subtipos de HbA<sub>1</sub> distintos, separáveis por eletroforese:

HbA<sub>1a</sub>, HbA<sub>1b</sub> e HbA<sub>1c</sub>. A fracção A1c diz respeito à hemoglobina glicada propriamente dita, com interesse clínico na diabetes mellitus, estando o seu aminoácido valina da porção terminal da cadeia beta ligado à glicose através de uma ligação não-enzimática, estável e irreversível<sup>2-3</sup>. O eritrócito é livremente permeável à molécula de glicose, o que faz com que a formação de hemoglobina glicada seja directamente proporcional à concentração de glicose no sangue<sup>4</sup>. Uma vez que a HbA1c se acumula no interior dos eritrócitos, a sua semivida está

dependente da destes, sendo em média cerca de 120 dias<sup>2,4</sup>. Em pessoas normais, a HbA1c corresponde a cerca de 3 a 6% da Hb total, podendo alcançar os 20% em diabéticos mal controlados<sup>4</sup>. Existem diversas situações que podem interferir com o valor de hemoglobina glicada. Por exemplo, o valor de HbA1c pode estar diminuído em situações de anemias hemolíticas, hemoglobinopatias, deficiência de eritropoietina, comprometimento da medula óssea, défices vitamínicos, doença hepática crónica, esplenomegalia, artrite reumatóide ou uso de antiretrovirais, assim como pode estar aumentado em determinadas hemoglobinopatias, anemias ferropénicas, alcoolismo crónico, esplenectomia, existência de hemoglobina carbamylada (ligação de ureia à hemoglobina na insuficiência renal crónica) ou situações que promovem o aumento do número de eritrócitos<sup>2-5</sup>.

Os ensaios clínicos DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) em 1993 e UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) em 1998 demonstraram que um controlo glicémico intensivo reduz as complicações crónicas microvasculares e eventualmente macrovasculares em doentes com diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2, respectivamente<sup>6-8</sup>. Desde então o controlo glicémico assumiu um papel muito importante e, uma vez que a HbA1c traduz os níveis de glicemia médios dos últimos 2 a 3 meses<sup>6-7,9</sup>, o seu doseamento tornou-se uma excelente ferramenta na avaliação do doente diabético. Contudo, como a HbA1c não fornece informações acerca da variabilidade glicémica ao longo do dia, a monitorização da glicemia capilar assume um papel de destaque para distinguir hiperglicemias pré ou pós-prandiais e para identificar hipoglicemias<sup>5</sup>. O conceito de glicose média estimada, ainda que com algumas limitações<sup>10-11</sup>, foi introduzido com vista a tentar transformar o valor de HbA1c numa informação mais facilmente compreendida pelo doente com o objectivo de aumentar a sua adesão ao tratamento e calcula-se através da seguinte equação matemá-

tica<sup>9</sup>: glicose média estimada (mg/dL) =  $28,7 \times \text{HbA1c} - 46,7$ . Assim a HbA1c é útil para monitorizar o controlo glicémico, para ajustar a terapêutica, para prever o risco de aparecimento de complicações crónicas e também para efectuar o diagnóstico de diabetes mellitus<sup>12</sup>. A utilização da hemoglobina glicada tem como vantagens o facto de o seu doseamento não necessitar de jejum<sup>12</sup>, de haver pouca variabilidade intraindividual<sup>11</sup> e de haver padronização da sua metodologia de análise<sup>13</sup> e tem como desvantagens o custo (apesar de ter vindo a decrescer) e a existência de condições que interferem com o seu valor real como foi descrito anteriormente.

Actualmente, existem diversas metodologias disponíveis comercialmente para doseamento da HbA1c que têm por base diferenças de carga iónica e/ou diferenças nas características estruturais entre as fracções glicadas e não-glicadas da hemoglobina<sup>3,4</sup>. Os laboratórios devem utilizar métodos certificados pelo National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP), sendo a escolha dependente da relação custo/eficácia de cada método considerando o risco potencial das interferências e a prevalência de determinadas patologias na população alvo<sup>3,4,14</sup>. Apesar de o doseamento da HbA1c em laboratório por HPLC de troca iónica ("High Performance Liquid Chromatography") ser considerado o *goldstandard*, a medição da HbA1c de forma rápida em aparelhos portáteis com uma amostra de sangue capilar tem apresentado crescente interesse clínico pela portabilidade dos aparelhos, rapidez de resultados e comodidade no seu uso<sup>15-16</sup>. Com a crescente e variada oferta comercial deste tipo de equipamentos torna-se necessário saber qual será o mais adequado para a prática clínica num Serviço de Endocrinologia que diariamente assiste inúmeros diabéticos, tanto no âmbito de internamento como de consulta externa.

O objectivo do presente estudo foi comparar dois sistemas portáteis de doseamento de HbA1c: DCA2000 e Quo-Test, cujas características estão sumarizadas no Quadro I<sup>17-18</sup>.

QUADRO I: Principais características dos sistemas portáteis de medição de HbA1c: DCA2000 e Quo-Test.

Nome do aparelho	Casa Comercial	Metodologia	Dimensões (cm)	Peso (Kg)	Tempo para fornecer resultado (minutos)
DCA2000®	Siemens Healthcare Diagnostics	Imunoensaio	27,2x24,1x23,9	5	6
Quo-Test®	Quotient Diagnostics	Afinidade ao ácido borónico	13,5x20,5x20,5	1,5	4

## MÉTODOS

Estudo prospectivo realizado na Consulta de Terapêutica Educacional da Diabetes (CTED) do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Santo António – Centro Hospitalar do Porto, entre os meses de Abril e Novembro de 2010. A população estudada consistiu em 52 doentes seguidos na CTED. Para cada doente foi efectuada uma colheita de amostra de sangue capilar para doseamento de HbA1C pelos sistemas DCA2000 e Quo-Test e de uma amostra de sangue venoso em tubo com anticoagulante (EDTA) para doseamento laboratorial de HbA1c por HPLC de troca iónica.

O aparelho DCA2000 (Siemens Healthcare Diagnostics) utiliza técnicas de imunoensaio, através de um anticorpo monoclonal que se liga à glicose da hemoglobina, sendo este complexo anticorpo-antigénio quantificado. O aparelho Quo-Test (Quotient Diagnostics) tem como metodologia a cromatografia por afinidade ao ácido borónico, uma vez que este reage com compostos cis dióis (compostos que apresentam dois hidroxilas no mesmo lado, como a molécula de glicose), permitindo a separação das fracções glicada e não-glicada da hemoglobina. O doseamento laboratorial de HbA1c por HPLC de troca iónica (Menarini HA-8160 – Menarini Diagnostics), tem por base diferenças de carga iónica (a hemoglobina não-glicada apresenta uma carga positiva quando comparada com a hemoglobina glicada).

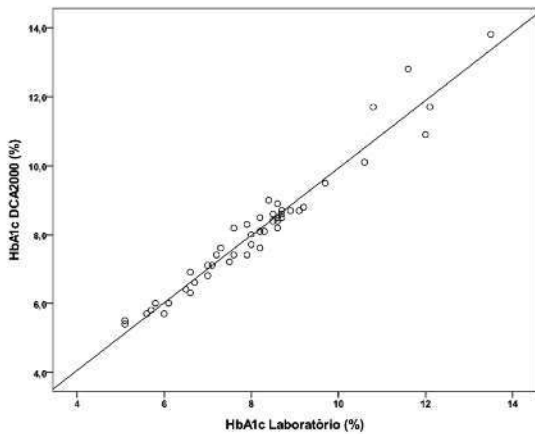
O tratamento estatístico dos dados foi realizado com a versão 18.0 do SPSS.

Procedeu-se à comparação, para cada doente, entre os resultados de HbA1c de cada analisador portátil e o resultado obtido laboratorialmente. Dividiu-se a amostra em 2 grupos de acordo com o valor da HbA1c laboratorial: um primeiro grupo com valores de HbA1c  $\leq 10\%$  e um segundo grupo com valores de HbA1c  $> 10\%$ . Utilizou-se o teste de correlação de *Pearson*, a regressão segundo *Passing e Bablok* e a metodologia de *Bland-Altman* para avaliar a concordância<sup>19</sup>, tendo sido calculada a diferença entre os valores obtidos por cada um dos aparelhos portáteis e o resultado da HbA1c laboratorial, foi posteriormente avaliado se esta diferença de valores era ou não estatisticamente significativa através do teste *t Student*. Foi considerado como nível de significância  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

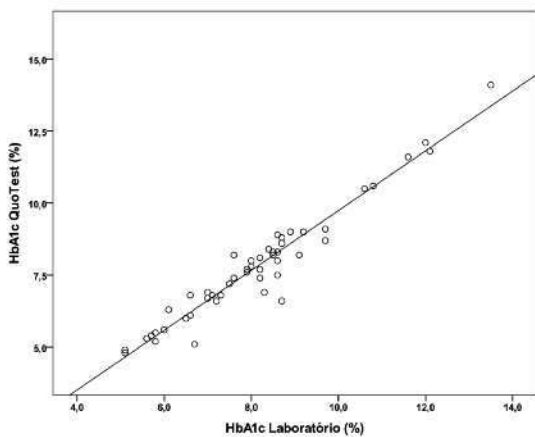
Nos 52 diabéticos estudados, o valor médio da HbA1c foi de  $8,08 \pm 1,79\%$  (5,4 - 13,8%) pelo sistema DCA2000; de  $7,78 \pm 1,91\%$  (4,8 - 14,1%) pelo Quo-Test e de  $8,11 \pm 1,71\%$  (5,1 - 13,5%) pelo método laboratorial. Comparando os valores de HbA1c obtidos em cada um dos aparelhos portáteis com os valores obtidos laboratorialmente encontrou-se uma correlação linear positiva e estatisticamente significativa. Para o sistema DCA2000 e para o laboratório, o coeficiente de correlação de *Pearson* foi de  $r = 0,98$ ,  $p < 0,001$  (Figura 1), e na regressão segundo *Passing e Bablok* obteve-se um declive de 0,96 (IC a 95% de 0,897 a 1,0) e

FIGURA 1: Gráfico de dispersão para as variáveis: HbA1c obtida por DCA2000 (imunoensaio) e HbA1c laboratorial.  $y = 0,143 + 0,979x$ .  $r=0,98$ .  $n=52$  doentes.



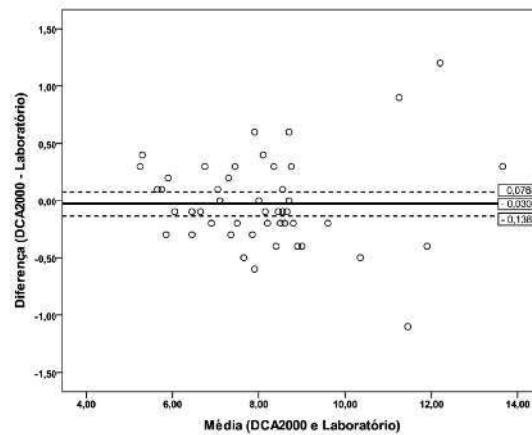
uma intercepção de 0,23 (IC a 95% de -0,10 a 0,76), resultados que demonstram concordância entre os resultados fornecidos por este equipamento e os resultados fornecidos pelo método de referência. Para o analisador Quo-Test e o laboratório, o coeficiente de correlação de Pearson foi de  $r=0,97$ ,  $p<0,001$  (Figura 2), e na regressão segundo

FIGURA 2: Gráfico de dispersão para as variáveis: HbA1c obtida por Quo-Test (afinidade ao boronato) e HbA1c laboratorial.  $y = - 0,638 + 1,038x$ .  $r=0,97$ .  $n=52$  doentes.



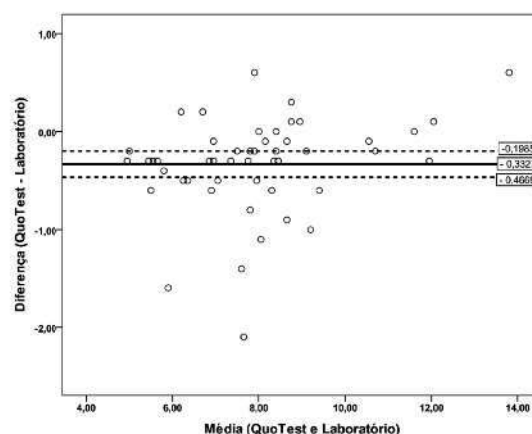
Passing e Bablok obteve-se um declive de 1,05 (IC a 95% de 1,0 a 1,109) e uma intercepção de -0,65 (IC a 95% de -1,14 a -0,30), resultados que demonstram um desvio negativo sistemático em relação ao método de referência. A diferença entre os valores obtidos pelo sistema DCA2000 e pelo método laboratorial foi em média 0,031% infe-

FIGURA 3: Gráfico de Bland-Altman para avaliação da concordância entre as variáveis: HbA1c obtida por DCA2000 (imunoensaio) e HbA1c laboratorial.  $n=52$  doentes. A linha a negrito representa o viés e as linhas a tracejado representam o intervalo de confiança a 95%.



rior pelo método portátil, IC a 95% de -0,138 a 0,077,  $p=0,574$  (Figura 3), ou seja, verificou-se concordância uma vez que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores de HbA1c obtidos pelo DCA2000 ou pelo laboratório. A diferença entre os valores obtidos pelo sistema Quo-Test e pelo laboratório foi em média 0,333% inferior pelo sistema portátil, IC a 95% de -0,467 a -0,199,  $p<0,001$  (Figura 4), logo não se verificou concordância porque houve

FIGURA 4: Gráfico de Bland-Altman para avaliação da concordância entre as variáveis HbA1c obtida por Quo-Test (afinidade ao boronato) e HbA1c laboratorial.  $n=52$  doentes. A linha a negrito representa o viés e as linhas a tracejado representam o intervalo de confiança a 95%.



diferenças estatisticamente significativas entre os valores de HbA1c obtidos por Quo-Test e pelo método de referência, confirman-

do-se o viés sistemático negativo: o aparelho Quo-Test forneceu resultados de HbA1c mais baixos, em média, 0,333%.

Com o objectivo de perceber se estes resultados se mantinham independentemente do valor quantitativo da HbA1c, dividiu-se a amostra em 2 grupos de acordo com o valor da HbA1c laboratorial: um primeiro grupo com valores de HbA1c  $\leq 10\%$  (46 dos 52 doentes) e um segundo grupo com valores de HbA1c  $> 10\%$  (6 dos 52 doentes). Fazendo o mesmo tipo de análise estatística, no grupo de doentes com HbA1c  $\leq 10\%$  encontraram-se resultados sobreponíveis: para os valores do sistema DCA2000 e do laboratório identificou-se um coeficiente de correlação de Pearson de  $r=0,973$ ,  $p<0,001$  (correlação linear positiva) e uma diferença entre os valores estatisticamente não significativa, sendo inferior para o sistema portátil em média 0,044%, IC a 95% de -0,128 a 0,041,  $p=0,304$  (existe concordância entre os valores); para o sistema Quo-Test e laboratório observou-se um coeficiente de correlação de Pearson de  $r=0,922$ ,  $p<0,001$  (correlação linear positiva) e uma diferença entre os valores obtidos pelos diferentes métodos estatisticamente significativa, sendo inferior para o sistema portátil em média 0,378%, IC a 95% de -0,522 a -0,235,  $p<0,001$  (não existe concordância entre os valores). Relativamente ao grupo de 6 doentes com valores laboratoriais de HbA1c  $> 10\%$ , obtiveram-se resultados diferentes: a correlação encontrada entre os valores obtidos pelo sistema DCA2000 e os do laboratório não foi estatisticamente significativa (coeficiente de correlação de Pearson de  $r=0,742$ ,  $p=0,091$ ) como é perceptível na extremidade direita da Figura 1; os resultados obtidos pelo sistema Quo-Test apresentaram correlação linear positiva e estatisticamente significativa com os resultados laboratoriais (coeficiente de correlação de Pearson de  $r=0,987$ ,  $p<0,001$ ) e verificou-se concordância entre eles, sendo os valores obtidos pelo analisador portátil em média 0,017% superiores, IC a 95% de -0,318 a 0,351,  $p=0,903$ .

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os resultados de HbA1c obtidos pelos sistemas DCA2000 e Quo-Test apresentam uma forte correlação linear positiva com os resultados do laboratório, ou seja, verificou-se que quanto maiores os valores laboratoriais de HbA1c, maiores os valores obtidos por cada um dos aparelhos portáteis. Mas, para além disso, importa também averiguar a veracidade destes valores, isto é, será que o valor obtido em minutos pelo aparelho portátil é exacto? Será que é concordante com o valor obtido laboratorialmente que é considerado o *goldstandard*? Qual dos aparelhos estudados apresenta resultados mais fiáveis?

Foi com o objectivo de responder a estas questões que efectuamos o presente estudo. Assim, para valores de HbA1c  $\leq 10\%$  verificou-se exactidão nos resultados obtidos pelo sistema DCA2000, isto é, concordância com os valores de HbA1c do laboratório, o que não se verificou nos resultados obtidos pelo sistema Quo-Test. Com este último método houve um viés sistemático no sentido de valores de HbA1c em média 0,378% mais baixos relativamente aos valores laboratoriais.

Quando analisamos os doentes com valores de HbA1c  $> 10\%$ , o analisador Quo-Test forneceu resultados correlacionados e concordantes com os do laboratório (ainda que ligeiramente superiores), tendo-se revelado o método mais exacto quando estamos perante valores de HbA1c mais elevados.

Em suma, neste estudo concluiu-se que, para valores de HbA1c  $\leq 10\%$ , os resultados obtidos por DCA2000 e por laboratório são correlacionados e concordantes ao passo que os valores de HbA1c obtidos por Quo-Test e por laboratório são correlacionados mas não-concordantes. No entanto, para valores de HbA1c mais elevados, observou-se que o aparelho Quo-Test apresentou valores mais fiáveis em comparação com o DCA2000.

Importante seria verificar a reprodutibilidade destes equipamentos, particularmen-

te com vários lotes de reagentes, uma vez que é conhecida a dependência da sua calibração em relação ao lote de reagente, no entanto não houve neste estudo disponibilidade para o fazer.

Tendo em mente que o objectivo destes equipamentos portáteis não é o de substituírem o laboratório clínico, mas sim o de fornecerem uma resposta capaz e rápida, não dispensando a confirmação laboratorial com periodicidade adaptada à situação clínica, importa conhecer as características que os distinguem do método de referência. O equipamento baseado na técnica de imunoensaio (DCA2000) mostrou ser mais fiável do que o equipamento baseado em metodologia de afinidade ao boronato (Quo-Test), excepto para os valores de HbA1c superiores a 10% que são menos frequentes na prática clínica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rahbar S, Blumenfeld O, Ranney HM. Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun.* 1969; 36: 838–43.
2. Gallagher EJ et al. A1c in the management of diabetes. *J Diab.* 2009;1:9–17.
3. Netto AP et al. Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA1c) para avaliação do controlo glicémico e para o diagnóstico da diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. *J Bras Patol Med Lab.* 2009. 45(1): 31-48.
4. Goldstein DE et al. Tests of Glycemia in Diabetes. *Diabetes Care.* 2004. 27:1761-73.
5. Dailey G. Assessing glycemic control with self-monitoring of blood glucose and hemoglobin A1c measurements. *Mayo Clin Proc.* 2007. 82:229-236.
6. DCCT Research Group. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulindependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993. 329:977-86.
7. Holman RR et al. 10-Year Follow-up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes *N Engl J Med* 2008;359:1577-89.
8. UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. *Lancet.* 1998. 352:837-53.
9. Nathan DM et al. Translating the A1C assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care.* 2008. 31:1473-8.
10. Leslie RDG, Kilpatrick ES. Response to Translation the A1C assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care.* 2009. 321:e11.
11. Little RR et al. HbA1c: how do we measure it and what does it mean? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2009. 16:113-118.
12. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes 2010. *Diabetes Care.* 2010. 33(Suppl. 1):S12–54.
13. The American Diabetes Association, European Association for the Study of Diabetes, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, and the International Diabetes Federation. Consensus



- Statement on the Worldwide Standardization of the Hemoglobin A1C Measurement. *Diabetes Care*. 2007. 30: 2399-400.
14. Little RR. Glycated hemoglobin standardization – National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) perspective. *Clin Chem Lab Med*. 2003. 41(9):1191-8.
  15. Mettewal A et al. A1cNow® InView™: A New Simple Method for Office-Based Glycohemoglobin Measurement. *J Diabetes Sci Technol*. 2007. 1:879-84.
  16. Lenters-Westra E, Slingerland RJ. Six of eight hemoglobin A1c point-of-care instruments do not meet the general accepted analytical performance criteria. *Clinical Chemistry*. 2010. 56:44-52.
  17. Quotient Diagnostics website. <http://www.quotientdiagnostics.com>
  18. Siemens website. <http://www.medical.siemens.com>
  19. Hirakata VN, Camey SA. Análise de concordância entre métodos de Bland-Altman. *Rev HCPA*. 2009;29(3):261-268.
  20. Shemest T et al. Agreement between laboratory results and on-site pathology testing using Bayer DCA2000+ and Cholestech LDX point-of-care methods in remote Australian Aboriginal communities. *Clin Chim Acta*. 2006. 367:69-76.
  21. Hawkins RC. Comparison of four point-of-care HbA1c analytical systems against central laboratory analysis. *Singapore Med J*. 2003. 44:8-11.
  22. Bode BW et al. Advances in Hemoglobin A1c Point of Care Technology. *J Diabetes Sci Technol*. 2007. 1: 319-25.

# Síndrome de Léri-Weill – da deformidade de Madelung ao diagnóstico genético

## *Léri-Weill dyschondrosteosis – from the Madelung deformity to the genetic diagnosis*

Filipa Neiva<sup>1</sup>, Sofia Martins<sup>2</sup>, Cíntia Castro-Correia<sup>3</sup>, Carla Costa<sup>3</sup>, Miguel Leão<sup>4</sup>, Manuel Fontoura<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Interna de Pediatria, Serviço de Pediatria, Hospital de Braga

<sup>2</sup> Assistente Hospital de Pediatria, Serviço de Pediatria, Hospital de Braga

<sup>3</sup> Assistente Hospital de Pediatria, Serviço de Pediatria, Hospital de S. João

<sup>4</sup> Assistente Hospital de Genética, Serviço de Genética Médica, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

<sup>5</sup> Professor Doutor, Chefe de Serviço de Pediatria, Serviço Pediatria – endocrinologia pediátrica, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Correspondência: Filipa Neiva › Rua Dr. José Maria Brandão, n.º 30, 3.º esquerdo › 4710-504 BRAGA › afneiva@gmail.com

### RESUMO

A baixa estatura afecta aproximadamente 2% das crianças e representa um dos motivos mais frequentes da consulta de endocrinologia pediátrica.

A heterogeneidade genética responsável pela baixa estatura sofreu um grande avanço com a descrição do gene *SHOX* (short stature homeobox-containing gene). A proteína codificada, localiza-se exclusivamente no núcleo de algumas células, e está envolvida na regulação do desenvolvimento, diferenciação e organogénese, com uma expressão limitada no espaço e no tempo. A expressão fenotípica é variável, com mais de 50 mutações do gene descritas. Mutações heterozigóticas do gene *SHOX* foram relatadas em casos de Síndrome de Léri-Weill (SLW).

Os autores descrevem o caso clínico de um adolescente enviado à consulta por baixa estatura. O estudo hormonal efectuado e a pesquisa de mutações para o gene *FGFR3* foram negativos. O aparecimento da deformidade de Madelung em radiografia dos membros superiores levou ao pedido do estudo molecular do gene *SHOX*. Foi detectado um padrão anómalo na região PAR1 com deleção dos exões 1-5 do gene confirmando-se a hipótese clínica de SLW. O estudo do gene *SHOX* deve ser considerado em alguns casos no estudo da baixa estatura.

### PALAVRAS-CHAVE

Baixa estatura; gene *SHOX*; Síndrome de Léri-Weill.

### ABSTRACT

Short stature affects approximately 2% of children, representing one of the most frequent disorders attending at endocrine pediatric consult.

The genetic heterogeneity responsible for the short stature suffered a significant advance with the description of the *SHOX* gene (short stature homeobox-containing gene). This gene encodes a nuclear protein involved in the development, differentiation and organogenesis with an expression limited in time and space. Phenotypic expression is variable, with more than 50 mutations described. Heterozygous *SHOX* mutations were shown to cause Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD). The authors report the clinical case of a male teenager seeking our consult for short stature. The hormonal study and mutational analysis of the *FGFR3* gene were negative. Molecular study for

*SHOX gene was undertaken after observation of Madelung deformity in the arm radiograph. An abnormality in the PAR1 region with deletion of exons 1-5 in SHOX gene confirmed the LWD diagnosis. Studying the SHOX gene should be considered in certain cases in the workup of short stature.*

#### KEYWORDS

*Short stature, SHOX gene; Léri-Weill dyschondrosteosis.*

## INTRODUÇÃO

O crescimento estatural é determinado por factores ambientais, hormonais e genéticos<sup>1</sup>. A baixa estatura afecta aproximadamente 2% das crianças, representando um dos motivos mais frequentes da consulta de endocrinologia pediátrica<sup>2,3</sup>.

A primeira descrição de baixa estatura por encurtamento mesomélico (antebraço e perna) foi efectuada em 1929 por Leri Weill<sup>4</sup>. Desde essa data outras entidades com encurtamento predominante do referido segmento têm sido descritas. O Síndrome de Leri-Weill (SLW) é uma delas e afecta as quatro extremidades. É um síndrome displásico de hereditariedade dominante e as suas características clínicas são: encurtamento mesomélico, cubitus valgus, subluxação cubital distal, fusão prematura das epífises, metacarpos e metatarsos curtos. Uma característica clínica e radiológica é o encurvamento do rádio e a deformidade de Madelung (desvio externo e dorsal do rádio, com subluxação do cúbito distal) que se torna evidente na maioria dos casos durante a adolescência e é mais frequente nas mulheres<sup>5</sup>.

A heterogeneidade genética responsável pela baixa estatura sofreu um grande avanço com a descrição em 1997 (Rao *et al* e Ellison *et al*) do gene *SHOX* (short stature homeobox-containing gene)<sup>1,2,3,5</sup>. Este gene está localizado na região pseudoautosómica dos cromossomas X e Y, é composto por 6 exões e codifica um factor de transcrição de 293 e 225 aminoácidos (*SHOXa* e *SHOXb*, respectivamente)<sup>1</sup>. A proteína codificada,

localiza-se exclusivamente no núcleo de algumas células<sup>3</sup>, e está envolvida na regulação do desenvolvimento, diferenciação e organogénese, com uma expressão limitada no espaço e no tempo<sup>5</sup>. A expressão fenotípica é variável<sup>3</sup>, com mais de 50 mutações do gene descritas ([www.shox.uni-hd.de](http://www.shox.uni-hd.de))<sup>6</sup>. Dados iniciais sugerem envolvimento da haploinsuficiência do gene na etiologia da baixa estatura idiopática (OMIM 604271) e baixa estatura no Síndrome de Turner, enquanto que a perda homozigótica do gene foi relacionada com a displasia mesomélica de Langer (OMIM 249700). Mutações heterozigóticas do gene *SHOX* foram relatadas em casos de SLW (OMIM 127300). A incidência estimada de mutações no gene *SHOX* está entre 1:2000 – 1:5000 na população geral e entre 1:40 – 1:150 na população com baixa estatura<sup>1</sup>. Estão descritas mutações do gene *SHOX* em 55-100% dos indivíduos com SLW, a maioria com deleções completas do gene<sup>7</sup>.

## DESCRIÇÃO DO CASO CLÍNICO

Adolescente do sexo masculino, enviado à consulta de Endocrinologia Pediátrica aos 12 anos por baixa estatura. Filho único de pais não consanguíneos. Antecedentes familiares de acidente vascular cerebral da mãe que na data da primeira consulta tinha 39 anos (altura 160 cm), e de baixa estatura na família do pai, nomeadamente o pai (na data da consulta 46 anos, altura 160 cm) e o avô paterno com baixa estatura e encurtamento dos membros inferiores.

Fruto de uma gestação vigiada, sem intercorrências. Nasceu por parto eutócico de termo, com asfixia perinatal, necessitando de reanimação após o nascimento (Apgar 2/5/7). Apresentava ao nascimento um peso de 3380 g (Percentil (P) 50), comprimento 49 cm (P10) e perímetro cefálico 35 cm (P50). O crescimento ponderal evoluiu no P75 e o estatural no P10.

Na primeira consulta, aos 12 anos, tinha uma estatura de 142,2 cm (P3-10), um peso de 48 kg (P50-75) e perímetro cefálico de 53 cm (P50). Ao exame objectivo apresentava fácies incaracterística, sem dismorfias, com encurtamento mesomélico dos membros superiores e inferiores. Sem outras alterações relevantes ao exame objectivo. A velocidade de crescimento (VC) no último ano tinha sido de 5,3 cm/ano (P50). Com uma idade de maturação óssea de 12 anos, um volume testicular de 8 ml bilateralmente, e pêlo púbico no estágio 3 (Tanner). A estatura alvo calculada a partir das alturas dos pais [Estatura do pai + (estatura da mãe + 13) / 2 ± 6,5] foi de 166,5 cm (com uma variação entre mais ou menos 6,5 cm). Efectuou estudo hormonal (T4 livre, TSH, 17-hidroxiprogesterona, LH, FSH) que estava normal. A hipótese de se tratar de uma baixa estatura familiar foi considerada e o adolescente manteve seguimento na consulta.

Repetiu estudo analítico cerca de 12 meses depois, apresentando IGF1 500 ng/ml (valor referência 152-540 ng/ml); IGFBP3 5,8 mg/l (valor referência 2,1-6,2 mg/l), LH, FSH e testosterona em níveis concordantes com o estágio Tanner apresentado. A velocidade de crescimento nos últimos 12 meses tinha sido 6,2 cm/ano (P<3). Aos 15 anos e 2 meses, com envergadura de 84 cm e segmento inferior com 70 cm (relação segmento superior/inferior = 1,2) por suspeita de hipocondroplasia foram pedidas as mutações mais frequentes do gene *FGFR3*. Nenhuma das mutações (Asn540Lys; Asn540Thr, Asn540Ser, Ile538Val, Lys650Asn, Lys650Met, Lys650Gln) foi encontrada no referido gene. Realizou radiografia do esque-

leto: diminuição do comprimento dos ossos longos dos membros inferiores e superiores, apresentando deformidade de Madelung (fig. 1). Por este motivo foi pedido estudo molecular do gene *SHOX* realizado em laboratório comercial (GENDIA, Antuérpia, Bélgica) ([www.gendia.net](http://www.gendia.net)). No estudo foi detectado um padrão anómalo com deleção heterozigótica dos exões 1 a 5 do gene *SHOX* e na região vizinha *PAR1*. A deleção desta extensão é considerada patogénica de acordo com os critérios da MutaDATABASE ([www.MutaDATABASE.org](http://www.MutaDATABASE.org)) e assim foi confirmado o diagnóstico de síndrome de Leri-Weill (SLW).

Actualmente com 17 anos, altura 157 cm e peso 60 kg, Tanner 5, relação segmento superior/inferior 1,76. Foi orientado para consulta de Genética Médica para estudo dos pais e aconselhamento genético.

FIGURA 1: Deformidade de Madelung.



## COMENTÁRIOS

O diagnóstico de SLW é fundamentalmente clínico e radiológico. Está confirmado que o gene *SHOX* é a principal causa do SLW, porém não se pode excluir a influência de outros genes. Assim, a presença de alterações específicas do gene *SHOX* confirmam o diagnóstico, mas a sua ausência não o exclui<sup>5</sup>. A baixa estatura ocorre nos primeiros anos de vida e geralmente o crescimento pubertário é pouco ou nada afectado<sup>7</sup>. Em geral, deve suspeitar-se de uma alteração no gene *SHOX* nos pacientes com: a) baixa estatura “idiopática”, especialmente

se estatura abaixo da estatura-alvo familiar, b) “baixa estatura familiar” especialmente se predominante no sexo feminino e, c) crescimento desproporcional dos antebraços e pernas<sup>1</sup>.

A mutação do gene *SHOX* pode, como descrito anteriormente, dar origem a múltiplos fenótipos mesmo dentro da mesma família<sup>1</sup>. O fenótipo está dependente da deficiência do produto génico funcional e não do tipo de mutação génica<sup>5</sup>. A deformidade de Madelung pode não ser evidente até à adolescência sobretudo no sexo masculino, e é geralmente precedida por sinais radiológicos<sup>1</sup>, com aconteceu no caso clínico descrito. Foram utilizados para o cálculo dos percentis, os gráficos de crescimento (altura, peso, perímetro cefálico e velocidade de crescimento) de Tanner e Whitehouse<sup>7,8</sup>, uma vez que são estes os utilizados na consulta de endocrinologia pediátrica do hospital. Estes gráficos apresentam a vantagem de contemplarem as variações ocorridas no crescimento durante a puberdade e incluem o P3 que corresponde a - 2 desvios padrão<sup>9</sup>.

A altura alcançada pelo adolescente está ligeiramente abaixo da estatura alvo prevista (166,5 com variação de mais ou menos 6,5 cm), mas de acordo com estatura média alcançada pelos doentes com SLW (155 cm, no sexo masculino<sup>1</sup>). Apesar de ainda não ter sido efectuado o estudo genético aos progenitores, o facto de o pai e avô paterno apresentarem baixa estatura e membros curtos aponta para uma possível transmissão paterna do gene mutado. Dados recentes demonstram que a maioria dos alelos *SHOX* mutados nos casos esporádicos são transmitidos pelo pai, este fenómeno foi também observado em estudo prévio sobre mutações *SHOX* em pacientes com baixa estatura inexplicada<sup>7</sup>. O efeito da hormona de crescimento neste síndrome é variável e são necessários mais estudos que apoiem ou revoguem a sua utilização<sup>7</sup>. Outras actuações possíveis são a cirurgia com correcção da angulação rádio-cárpica,

alargamento ósseo em caso de dor, transtorno funcional ou hipocrescimento patológico<sup>5</sup>. Neste caso não se preconizou qualquer tipo de tratamento.

Por se tratar de um síndrome de transmissão dominante, o aconselhamento genético é importante. O estudo dos pais deve ser efectuado para avaliar se esta variação é herdada ou *de novo*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Leka SK, Kitsiou-Tzeli S, Kalpini-Mavrou A, Kanavakis E. Short stature and dysmorphology associated with defects in the SHOX gene. *Hormones (Athens)*. 2006;5(2):107-18.
2. Rappold G, Blum WF, Shavrikova EP, *et al*. Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. *J Med Genet*. 2007;44(5):306-13.
3. Rao E, Blaschke RJ, Marchini A, Niesler B, Burnett M, Rappold GA. The Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Hum Mol Genet*. 2001;10(26):3083-91.
4. Leri A, Weill J. Une affection congénitale et symétrique du développement osseuse: la dyschondrosteose. *Bull Soc Med Hop*. 1929;53:1491-4.
5. Llano-Rivas I, Fernández-Toral J, Navarro-Vera I. Discondrosteosis de Leri-Weill. Mutación en gen SHOX y expresividad variable. *An Pediatr (Barc)*. 2011;74(6):405-8.
6. Niesler B, Fischer C, Rappold GA. The human SHOX mutation database. *Hum Mutat*. 2002;20(5):338-41.
7. Binder G, Renz A, Martinez A, *et al*. SHOX Haploinsufficiency and Leri-Weill Dyschondrosteosis: Prevalence and Growth Failure in Relation to Mutation, Sex, and Degree of Wrist Deformity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(9):4403-8.
8. Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M. Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity and weight velocity: British children 1965. Part II. *Arch Dis Child*. 1966;41(220):613-35.
9. Wright CM, Booth IW, Buckler JM, *et al*. Growth reference charts for use in the United Kingdom. *Arch Dis Child*. 2002;86(1):11-4.

# Hiponatremia e Macro-adenoma da hipófise

## *Hyponatremia and Pituitary Macroadenoma*

Ana Araújo<sup>1</sup>, Pedro Soares<sup>1</sup>, Míriam Magalhães<sup>1</sup>, Clara Brito<sup>1</sup>, Diana Fernandes<sup>1</sup>, Luísa Teixeira<sup>1</sup>, Leonel Pinto<sup>2</sup>, Renato Saraiva<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Interno em Formação Específica de Medicina Interna, Serviço de Medicina 1, Centro Hospitalar Leiria - Pombal

<sup>2</sup> Assistente em Medicina Interna, Serviço de Medicina 1, Centro Hospitalar Leiria - Pombal

<sup>3</sup> Director de Serviço, Serviço de Medicina 1, Centro Hospitalar Leiria - Pombal

Correspondência: Ana Araújo › Hospital de Santo André – Leiria › Serviço de Medicina 1 › Rua Olhalvas – Pousos 2410-197 LEIRIA › anamlaraujo@gmail.com

### RESUMO

A regulação do equilíbrio natrémico é mediada entre outros por osmoreceptores hipotalâmicos que controlam os mecanismos da sede e da secreção de hormona anti-diurética. Qualquer lesão ou compromisso do hipotálamo ou da hipófise anterior podem alterar este balanço. Os autores descrevem o caso clínico de uma doente de 61 anos que se apresentou ao serviço de urgência com manifestações neurológicas em contexto de uma hiponatremia grave cuja investigação médica levou ao raro diagnóstico de insuficiência adrenal secundária a um macroadenoma da hipófise. Nestes casos, a hiponatremia resulta principalmente da diminuição de efeito de feedback negativo dos glicocorticóides sobre a hormona anti-diurética e/ou da diminuição da filtração glomerular devido ao hipocortisolismo.

### PALAVRAS-CHAVE

Hiponatremia; Macroadenoma da hipófise; Insuficiência adrenal secundária.

### ABSTRACT

Regulation of sodium level is mediated by several mechanisms, including hypothalamic osmoreceptors which control thirst and excretion of anti-diuretic hormone. Any injury or impairment of the hypothalamus or anterior pituitary may alter sodium balance. The authors describe a case of a patient of 61 years who presented to emergency department with neurological manifestations in a context of severe hyponatremia whose medical research led to the rare diagnosis of adrenal insufficiency secondary to a pituitary macroadenoma. In these cases, hyponatremia results mainly from decreased negative feedback effect of glucocorticoids on the anti-diuretic hormone and / or decreased glomerular filtration due to hypocortisolism.

### KEYWORDS

Hyponatremia; Pituitary macro-adenoma; Secondary adrenal insufficiency.

---

## INTRODUÇÃO

O sódio é o catião extracelular dominante, não atravessa a membrana celular livre-

mente pelo que assume um papel extremamente importante no equilíbrio osmótico. De facto, a sua homeostase é vital para o normal funcionamento das células. O seu

nível sérico normal varia de 135-145 mEq/L. A hiponatremia (HN), definida como um nível sérico inferior a 135 mEq/L, é considerada grave quando inferior a 125 mEq/L<sup>1</sup>. É um distúrbio electrolítico frequente e sinal de doenças relativamente comuns como a insuficiência cardíaca, a insuficiência renal ou a cirrose hepática. Raramente se apresenta como primeira manifestação de macroadenoma da hipófise<sup>2</sup>. Os adenomas hipofisários são os tumores intracranianos mais frequentes nos adultos<sup>3</sup> e são responsáveis pela maioria das síndromas de hipo ou hipersecreção de hormonas hipofisárias<sup>4</sup>. Desenvolvem-se a partir de células epiteliais pituitárias e representam cerca de 10-15% de todos os tumores intracranianos. São chamados de macroadenomas quando têm diâmetro superior a 10 mm e de microadenomas quando menores<sup>3</sup>. A sua origem ainda não está completamente esclarecida. No entanto, a teoria mais plausível assenta numa transformação neoplásica monoclonal das células pituitárias<sup>4</sup>. De facto, a natureza monoclonal da maioria dos tumores hipofisários e a sua falta de resposta ao retrocontrolo negativo das hormonas produzidas pelos órgãos-alvo reforçam esta hipótese<sup>3</sup>. Em regra geral, são benignos, sendo rara a neoplasia maligna com metastização. A morbidade e a mortalidade que lhes estão associadas, relacionam-se essencialmente com as complicações resultantes do efeito de massa por compressão das estruturas vizinhas e da disfunção endócrina<sup>3</sup>. As alterações hormonais observadas dependem do tipo de célula que está na origem da neoplasia. Existem tumores lactotrofos, somatotrofos, corticotrofos, tirotrofos, gonadotrofos ou mesmo pluri-hormonais. De referir que 30% não são clinicamente secretores, chamados de não-funcionantes<sup>4</sup>.

## CASO CLÍNICO

Doente de 61 anos, do sexo feminino, com antecedentes de hipertensão arterial,

diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, obesidade grau I, otosclerose do ouvido esquerdo e síndrome depressiva que recorreu ao serviço de urgência (SU) por tonturas, desequilíbrio, cefaleias, náuseas, vômitos, disartria e sonolência com uma semana de evolução. Tratava-se de uma doente medicada diariamente com 300 mg de acarbose, 120 mg de gliclazida, 1500 mg de metformina, 2,5 mg de indapamida e 10 mg de escitalopram.

Aquando da observação, apresentava-se sonolenta, desorientada e disártrica. Apirética, não eram evidentes sinais de rigidez da nuca. Com prova de Romberg estável na linha média, sem evidência de marcha atáxica sendo que o restante exame neurológico sumário apenas objectivou discreto nistagmus do olhar conjugado horizontal bilateral sugerindo uma síndrome vertiginosa periférica. Hemodinamicamente estável, exibia uma auscultação cardio-pulmonar normal, não se observavam edemas periféricos, alterações da pele, pilosidade ou distribuição da gordura corporal em relação com o género e a idade.

Numa primeira abordagem, realizou no SU, análises de rotina englobando hemograma, função renal, hepática, ionograma e doseamento da proteína C reactiva que revelaram uma HN grave de 113 mmol/L e uma hipocaliémia de 2,3 mmol/L, um electrocardiograma (ECG) que não demonstravam alterações de ritmo e uma tomografia axial computadorizada (TAC)-crânioencefálica (CE) que levantou a hipótese de uma lesão expansiva selar e supra-selar (fig. n.º 1).

Posteriormente internada no Serviço de Medicina 1, realizou doseamento da osmolaridade sérica e estudo da urina das 24 horas com doseamento da microalbuminúria, depuração da creatinina e ionograma com intuito de averiguar etiologia das alterações iónicas acima descritas (quadro n.º I). Este evidenciou uma perda urinária de sódio importante. A interpretação das osmolaridades séricas e urinárias revelou uma excreção de água inadequadamente baixa.



FIGURA 1

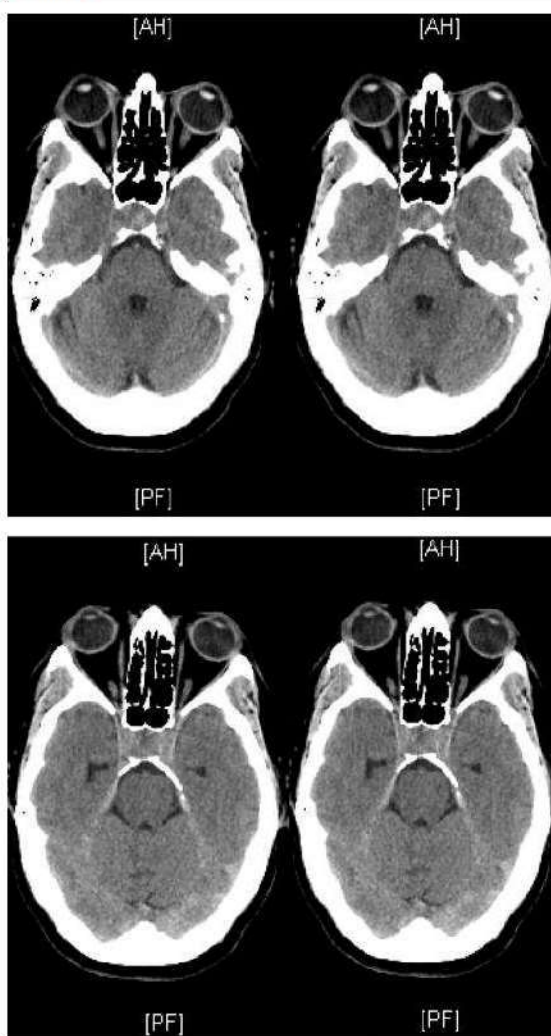
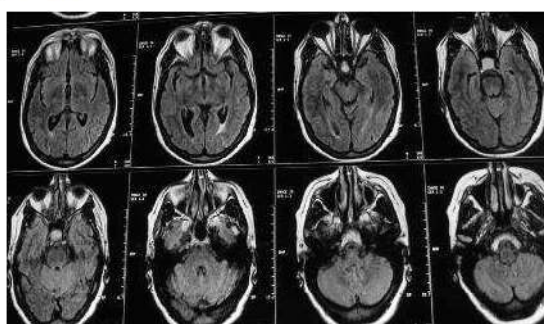


FIGURA 2



Foi também sujeita á realização de uma ressonância magnética nuclear (RM) da região selar (fig. n.º 2) que confirmou uma lesão expansiva com crescimento supra e infra-selar medindo cerca de 2,0 x 1,6 cm que na sua extensão inferior condicionava erosão do pavimento selar, exercendo superiormente efeito de massa sobre o quiasma óptico e que lateralmente envolvia parcialmente ambas as carótidas internas sem envolvimento dos seios cavernosos. Perante o diagnóstico imagiológico de macroadenoma da hipófise, foi feita a sua caracterização hormonal com estudo dos seus eixos (quadro n.º II) que demonstrou défice de somatotrofina, hipogonadismo hipogonadotrófico e hipocortisolismo secundário. O macroadenoma não revelou ter características secretoras, estando associado a deficiência de vários eixos mas sem

QUADRO I

	Doseamentos	Valores de Referência	Apreciação
Sumária da Urina	pH:7 Leucócitos: 15/µL Nitritos: Negativo Proteínas: Glicose: Negativo Eritrócitos: Negativo Bilirrubina: Negativo Urobilinogénio: 2 E.U./dL Acetona: Negativo	pH:7 Até 75/µL Negativo Negativo Negativo Negativo Negativo Até 2 E.U./dL Negativo	Proteinúria
Urina das 24h	Na <sup>+</sup> : 327 mmol/L K <sup>+</sup> : 100 mmol/L Microalbuminúria: 429 mg/24h Depuração da creatinina: 115,7 ml/min Osmolaridade urinária: 286,7 Osm/L	40-220 mmol/L 25-125 mmol/L <30 mg/24h 61 -166 ml/min Variável	Perda renal de Na <sup>+</sup> Nefropatia de provável etiologia diabética, sem alteração de função depurativa do rim
Osmolaridade sérica	282 Osm/L	280-295 Osm/L	Normal
	Osmolaridade Urinária > Osmolaridade Sérica		Concentração Urinária Inadequada: baixa excreção de água

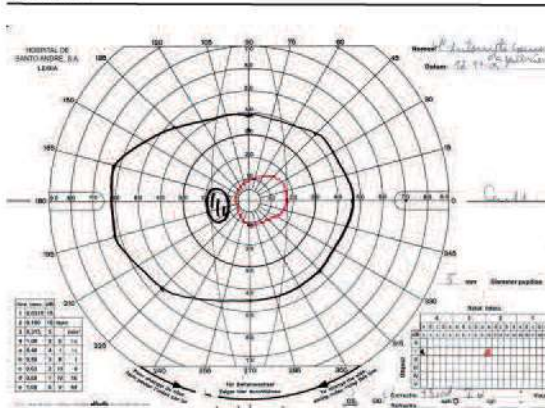
QUADRO II

	Doseamentos	Valores de Referência	Apreciação
Somatotrofo	IGF1 35 µg/L	135 -449 µg/L	Défice de Somatostatina
Godanotrofo	FSH 2,4 UI/L LH 0,4 UI/L Estradiol 9,0 pg/mL Progesterona 0,29 ng/mL	16,7 -114 UI/L 10,87 -58,6 UI/L <20pg/ml 0,10 -0,78 ng/mL	Hipogonadismo hipogonadotrófico
Trireotrofo	T3L 4,2 pmol/L T4L 8,7 pmol/L TSH 1,72 µUI/mL  Prova TRH: TSH 0' 1,7 µUI/mL 20' 8,2 µUI/mL 60' 1,8 µUI/mL	1,34 -2,73 mol/L 7,9 -14,4 pmol/L 0,34 -5,6 µUI/mL  Incremento ≥ 5 µUI/mL	Função Tiroidea normal
Corticotrofo	ACTH <5ng/mL Cortisol 1,9 µg/dL  Prova Tetracosactideo: Cortisol 0' 2,4 µg/dL Cortisol 20' 9,7 µg/dL Cortisol 60' 15 µg/dL	9 -52 ng/L 5 -25 µg/dL  Duplicação aos 20' e >20 µg/dL	Hipocortisolismo hipocorticotrófico (secundário)
Lactotrofo	Prolactina 22,3 ng/mL	2,74-19,64 ng/mL	Ligeiro aumento

pan-hipopituitarismo. A hiponatremia foi então facilmente enquadrada no contexto de insuficiência corticossupra-renal secundária. A lesão demonstrada e caracterizada do ponto de vista hormonal, interessou avaliar o grau de compressão sobre o quiasma óptico e estruturas vizinhas pelo que foi submetida a uma campimetria (fig n.º 3) que evidenciou defeito arciforme superior do campo visual direito.

O tamanho e defeito visual incipiente mas detectável consistiu critério para ressecção transesfenoidal. A doente além de medicada com hidrocortisona (15 mg diários) com regressão da hiponatremia, foi orientada para uma consulta de neurocirurgia.

FIGURA 3



## DISCUSSÃO

A hiponatremia resulta de uma alteração no balanço da água e cursa com hiposmolaridade. A regulação deste equilíbrio é mediada por osmoreceptores hipotalâmicos que perante alterações da osmolalidade plasmática determinam modificações na ingestão e excreção de água através do mecanismo da sede e secreção de hormona anti-diurética (HAD). Qualquer compromisso do hipotálamo ou da hipófise posterior pode comprometer este mecanismo<sup>5</sup>.

A osmolaridade sérica baixa que normalmente acompanha a hiponatremia leva passagem de água do espaço intravascular para o espaço intracelular cerebral. Este processo baseado no equilíbrio osmótico resulta em hiperhidratação celular e consequente edema cerebral. A severidade das manifestações neurológicas relaciona-se directamente com o grau de hidratação celular<sup>6</sup>. Os primeiros sintomas incluem náuseas, mal-estar mas podem rapidamente evoluir para convulsões, coma ou até paragem respiratória por hérnia tentorial posterior com compressão do tronco cerebral<sup>1</sup>. No entanto, é de

referir que a hiponatremia crónica associa-se a mecanismos compensatórios que limitam o edema cerebral, permitindo que os pacientes se mantenham assintomáticos até valores natrémicos de 115-120mEq/L. Abaixo desses valores, exibem sintomas frustes e inespecíficos como fadiga, náuseas, tonturas e distúrbios da marcha<sup>7,8,9</sup> em concordância com o caso clínico apresentado. Interessante, salientar, que por razões mal esclarecidas, as mulheres pré-menopáusicas tem menor capacidade de adaptação passando rapidamente de sintomas benignos como cefaleias e náuseas para paragem respiratória<sup>10</sup>. Perante uma situação de hiponatremia crónica, é necessário fazer a reposição de sódio de forma lenta. O sistema de adaptação cerebral em curso, protector frente ao edema dificulta o tratamento podendo mesmo complicá-lo com mielinólise hiperosmótica<sup>11</sup>.

A hiponatremia sintomática como primeira manifestação de tumor hipofisário é rara. Aparece essencialmente em doentes com mais de 70 anos, o que torna peculiar o caso exposto<sup>2</sup>. A hiponatremia é nesses casos devida á insuficiência corticossuprarrenal secundária que ocorre em 30% dos macroadenomas<sup>12</sup>. Ocorre por diluição e resulta principalmente da diminuição de efeito de feedback negativo dos glicocorticóides sobre a HAD e/ou da diminuição da filtração glomerular devido ao hipocortisolismo.

Em análise do caso exposto é interessante lembrar que as alterações iónicas explicam-se parcialmente pela terapêutica com diuréticos. De facto, a indapamida ao actuar na porção inicial do tubo contornado distal leva a depleção de volume (com consequente elevação de HAD e reabsorção proximal de sódio), depleção de sódio por inibição directa da reabsorção no tubo contornado distal e depleção de potássio (saída de ião intracelular para espaço extracelular para manter carga eléctrica dos compartimentos). De referir também que pelo seu mecanismo de acção, a indapami-

da agravou a hiponatremia secundária a insuficiência adrenocortical ao contrário do que seria de esperar com os diuréticos da ansa que interferem na capacidade de retenção da HAD<sup>5</sup>. De facto, os resultados urinários confirmam a depleção urinária de sódio e sugerem pelo facto de a osmolaridade urinária ser superior a osmolaridade sérica, incapacidade renal em excretar água. A realização de TAC-CE no SU foi o ponto de partida para o estudo de outra causa para o desequilíbrio hidro-electrolítico observado e a hipótese de lesão hipofisária mostrava-se verossímil.

O tamanho da hipófise varia com a idade, sexo, e estado fisiológico do indivíduo<sup>13</sup>. A RM da sela turca é o exame complementar de escolha para avaliar a glândula pituitária e caracterizar a extensão de um adenoma<sup>14</sup>. No entanto, a campimetria é essencial na avaliação e monitorização do doente. A expansão do tumor, ao ultrapassar a sela turca, pode comprimir o quiasma óptico ou mesmo invadir o seio cavernoso e ápex orbitário com perda progressiva da visão<sup>4</sup>.

A avaliação da actividade hormonal dos adenomas hipofisários passa pelo doseamento das hormonas que estão na dependência do eixo hipotálamo-hipófise mas também na realização de provas endócrinas dinâmicas. Sabe-se que por exemplo o doseamento de cortisol sérico e urinário tem sensibilidade e especificidade limitada no diagnóstico de insuficiência adrenal secundária<sup>15</sup>. As provas efectuadas posteriormente ao internamento em serviço de Medicina, foram realizadas no serviço de Endocrinologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra após suspensão de terapêutica previamente instituída. As provas efectuadas foram da hormona de libertação de tirotrópina (TRH) e do tetracosactídeo.

A Hormona estimuladora da tiróide (TSH) é uma hormona produzida e libertada pelos tirotrofos. A sua secreção é dependente da acção hipotalâmica (através da TRH) e das hormonas da tiróide. O teste com TRH é útil na avaliação da reserva hipofisária e

pode-se realizar em casos de suspeita de hipotireoidismo de causa central (tumores, pós cirurgia ou radioterapia, e outras causas de hipopituitarismo). A administração de 200 µg de TRH endovenosa (ev) deve nos indivíduos normais levar ao aumento de TSH, de 5UI/l ou de cerca de dez vezes o valor basal dentro de quinze ou trinta minutos<sup>16</sup>. Nos casos de lesão hipofisária, a resposta é baixa enquanto que na lesão do hipotálamo é observada uma resposta normal ou exagerada. Contudo, refere-se que alguns indivíduos com doença hipofisária podem responder à TRH e que os idosos ou indivíduos deprimidos podem evidenciar resposta inadequada e de difícil interpretação<sup>16</sup>. Os resultados obtidos foram perfeitamente normais.

A prova do tetracosactídeo visa a estudar o eixo hipotálamo – hipófise – córtex supra-renal. Apresenta boa sensibilidade e especificidade quando comparado com o teste de tolerância de insulina<sup>18</sup>. Consiste na administração ev ou intramuscular de 250 µg de corticotropina ou tetracosactídeo com posteriores doseamentos de cortisol aos vinte e sessenta minutos. Um valor plasmático basal ou após estimulação superior ou igual a 20 µg/L torna pouco provável o diagnóstico de insuficiência adrenal. Valores inferiores a 9 µg/L indicam a necessidade de corticoterapia<sup>15</sup>. Os valores iniciais baixos de ACTH e de cortisol na doente foram fortemente sugestivos de hipocortisolismo secundário. Enquadrados num contexto clínico de encefalopatia metabólica grave motivaram a administração de hidrocortisona pelo que a prova do tetracosactídeo efectuada depois desta atitude terapêutica tornou-se de difícil interpretação. De salientar que os valores após estimulação mantiveram-se no entanto inferiores ao valor de corte de 20 µg/L.

## CONCLUSÃO

O edema cerebral é a causa das manifestações neurológicas da hiponatremia<sup>6,19,20</sup>,

sendo a gravidade dos sintomas directamente proporcional a rapidez de instalação do distúrbio electrolítico. O interesse deste caso reside no facto da hiponatremia ter sido a primeira manifestação da insuficiência da cortico-supra-renal secundária ao macroadenoma hipofisário. As alterações hidroelectrolíticas observadas na avaliação inicial da doente podiam perfeitamente terem sido enquadradas num caso de iatrogenia secundária a indapamida. A realização de TAC-CE é que orientou o diagnóstico descrevendo uma massa selar. Este caso exemplifica a importância muitas vezes esquecida da abordagem sistematizada da hiponatremia assim como da pesquisa de causas mais raras. De facto, o tratamento específico, dirigido e atempado melhora significativamente o prognóstico dos doentes.

## BIBLIOGRAFIA

1. <http://emedicine.medscape.com/article/242166-clinical> (22/04/2011)
2. Veja J, *et al.* Hiponatremia sintomática como forma de apresentação clínica de un macroadenoma hipofisario. Comunicación de três casos. *Rev Med Chile*, 2009;137:1607-1612
3. <http://emedicine.medscape.com/article/123223-overview> (22/04/2011)
4. Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL e Jameson JL. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 16<sup>ta</sup> Edição, 2005, McGraw-Hill, p2080-2084.
5. Abreu F, de Sousa FT e Prata MM. Hiponatremia: abordagem clínica e terapêutica. *Medicina Interna* 2001;8: 37-48.
6. Rose BD Post TW. *Clinical Physiology of Acid-Base and Electrolyte Disorders*, 5<sup>a</sup> edição, 2001, McGraw-Hill, p716-720 e p761-764.
7. Ellis, SJ. Severe hyponatraemia: Complications and treatment. *QJM*, 1995;88:905-909.
8. Sterns RH, Cappuccio JD, Silver SM, Cohen EP. Neurologic sequelae after treatment of severe hyponatremia: A multicenter perspective. *J Am Soc Nephrol*, 1994;4:1522-1530.
9. Chow KM, Kwan BC, Szeto CC. Clinical studies of thiazide-induced hyponatremia. *J Natl Med Assoc* 2004; 96:1305.
10. Ayus JC, Wheeler JM, Arieff AI. Postoperative hyponatremic encephalopathy in menstruant women. *Ann Intern Med*, 1992;117:891-7.
11. Lien YH, Shapiro JL, Chan L. Study of brain electrolytes and osmolytes during correction of chronic hyponatremia. Implications for the pathogenesis of central pontine myelinolysis. *J Clin Invest*, 1991;88:303-309.
12. Dorin RI, Qualls CR, Crapo LM. Diagnosis of Adrenal Insufficiency. *Ann Intern Med*, 2003;139:194-204.
13. Coronho V, Petroianu A, Santana EM, Pimenta LG. *Tratado de endocrinologia e cirurgia endócrina*, 1<sup>a</sup> Edição, 2001, Guanabara-koogan, p761-772.
14. Tella OI, Herculano MA, Delcello R, Aguiar PH. Adenomas hipofisários produtores de ACTH, aspectos neurocirúrgicos. *Arq Neuropsiquiatr*, 2002;60(1):113-118.
15. Alves M, Souto SB, Neves C, Carvalho Braga D e Medina JL. Protocolo de diagnóstico e tratamento de insuficiência supra-renal aguda. *Rev Port Endocrinologia, diabetes e metabolismo*, 2008;1:23-29.
16. Spencer CA, Schwarzbein D, Guttler RB, *et al.* Thyrotropin (TSH)-releasing hormone stimulation test response employing third- and fourth-generation TSH assays. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993;76:494-498.
17. Snyder PJ, Jacobs LS, Rabello MM, Sterling FH, *et al.* Diagnostic value of thyrotrophin-releasing hormone in pituitary and hypothalamic diseases. Assessment of thyrotrophin and prolactin secretion in 100 patients. *Ann Intern Med*, 1974; 81:751-757.
18. Agha A, Tomlinson JW, Clark PM, Holder G and Stewart PM. The long-Term Predictive Accuracy of the short Synacthen (corticotrophin) Stimulation Test for Assessment of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis. *The Journal of clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006;91(1):43-47.
19. Yeates KE, Singer M, Morton AR. Salt and water: a simple approach to hyponatremia. *CMAJ*, 2004;170:365-367.
20. McManus ML, Churchwell KB, Strange K. Mechanisms of disease: Regulation of cell volume regulation in health and disease. *N Engl J Med*, 1995;333:1260-1267.

# Tuberculose da glândula tiroideia em doente com doença de Graves

## *Tuberculosis of the thyroid gland in a patient with Graves' disease*

Maria Raquel Carvalho<sup>1</sup>, Catarina Guimarães<sup>2</sup>, Zulmira Jorge<sup>3</sup>, Dolores López Presa<sup>4</sup>, Isabel do Carmo<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Interna Complementar de Endocrinologia; Serviço de Endocrinologia Diabetes e Metabolismo; Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte (CHLN) - EPE

<sup>2</sup> Interna Complementar de Pneumologia; Serviço de Pneumologia; Centro Hospitalar de Coimbra - EPE

<sup>3</sup> Assistente Hospitalar; Serviço de Endocrinologia; Hospital de Santa Maria, CHLN-EPE

<sup>4</sup> Assistente Hospitalar; Serviço de Anatomia Patológica; Hospital de Santa Maria, CHLN-EPE

<sup>5</sup> Directora de Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo; Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte (CHLN) - EPE

Correspondência: Maria Raquel Carvalho › Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo › Avenida Professor Egas Moniz › 1649-035 LISBOA › mariaraquelcarvalho.hsm@gmail.com

### RESUMO

A tuberculose tiroideia é uma entidade clínica rara, que ocorre geralmente em contexto de infeção sistémica por *Mycobacterium tuberculosis*. A apresentação clínica é variável mas, na maioria dos casos, apresenta-se como uma massa cervical anterior.

Apresentamos o caso de uma mulher de 30 anos com doença de Graves em quem foi identificado granuloma tuberculoso na histologia da peça de tiroidectomia total.

A partir de uma breve revisão da literatura, chamamos a atenção para os aspectos particulares deste caso clínico.

### PALAVRAS-CHAVE

Tuberculose; Granuloma; Tíróide; Hipertiroidismo.

### ABSTRACT

*Tuberculosis involving the thyroid gland has been infrequently reported and it usually occurs when there is a systemic Mycobacterium tuberculosis infection. The clinical presentation is quite variable but it usually presents as an anterior cervical mass.*

*We present the case of a 30-years-old woman with Graves' disease in whom the diagnosis of thyroid tuberculosis was made in the histopathologic exam of the thyroid gland.*

*We describe a brief literature review and emphasize the particular aspects of this clinical case.*

### KEYWORDS

*Tuberculosis; Granuloma; Thyroid; Hyperthyroidism.*

## INTRODUÇÃO

Em Portugal, a prevalência de tuberculose é de 23/100000 habitantes<sup>1</sup>. A infecção da glândula tiroideia por *Mycobacterium tuberculosis* é muito rara, mesmo em países em que a tuberculose é endémica. A glândula tiroideia pode ser infectada por via hematogénea, por disseminação linfática ou por extensão directa a partir de nódulos linfáticos adjacentes infectados<sup>2</sup>. A apresentação clínica é variável mas, na maioria dos casos, apresenta-se como uma massa cervical anterior<sup>3</sup>. O diagnóstico é feito com a identificação microbiológica ou pelos aspectos histológicos<sup>4</sup>. Quando não existe concentração suficiente de bacilos, pode não conseguir-se identificar o microorganismo. Este facto não impede o diagnóstico, desde que os achados histológicos sejam específicos<sup>5</sup>.

O diagnóstico correcto é muito importante para que se possa instituir terapêutica médica específica e, nalguns casos, evitar o procedimento cirúrgico.

Descrevemos o caso de uma doente com doença de Graves em quem foi diagnosticada tuberculose tiroideia no exame anatomo-histológico da peça de tiroidectomia total.

## CASO CLÍNICO

Doente de sexo feminino de 30 anos, caucasiana, residente em comunidade cigana, sem antecedentes médicos relevantes.

Apresentava queixas de palpitações, hiperdefecação, hipersudorese, intolerância ao calor, polifagia e perda ponderal de 3kg desde os dois meses anteriores. Negava febre, dor cervical ou outras queixas.

O exame objectivo evidenciou: bócio ligeiro, sem nódulos ou massas anómalas cervicais palpáveis, ausência de exoftalmia, frequência cardíaca de 95 bpm.

A avaliação bioquímica revelou: TSH < 0,01  $\mu$ U/mL (V.R.: 0,4-4,5  $\mu$ U/mL), FT4 4 ng/dL (V.R.: 0,9-1,7 ng/dL), FT3 12 pg/mL (V.R.: 2-4,4 pg/mL), TRAbs 13,2 U/L (V.R.: < 1,5 U/L).

FIGURA 1: Cintigrafia tiroideia com <sup>99m</sup>Tc



A cintigrafia tiroideia com <sup>99m</sup>Tc (fig. 1) mostrou hipercaptação difusa do radionuclídeo e a ecografia uma glândula difusamente aumentada, com margens regulares e heterogeneidade difusa do parênquima, sem nódulos e sem adenomegalias cervicais.

A doente iniciou terapêutica com antitiroídeos de síntese (propiltiouracilo) que manteve durante dezoito meses. Passados doze meses a doença recidivou. Laboratorialmente: TSH < 0,01  $\mu$ U/mL (V.R.: 0,4-4,5  $\mu$ U/mL), FT4 5,59 ng/dL (V.R.: 0,9-1,7 ng/dL), FT3 13,4 pg/mL

FIGURA 2: Granuloma epitelióide com necrose caseosa central

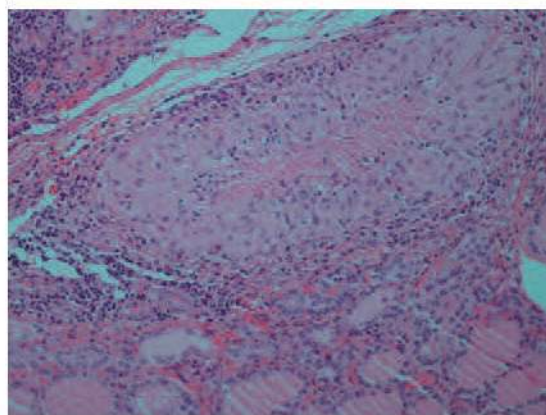
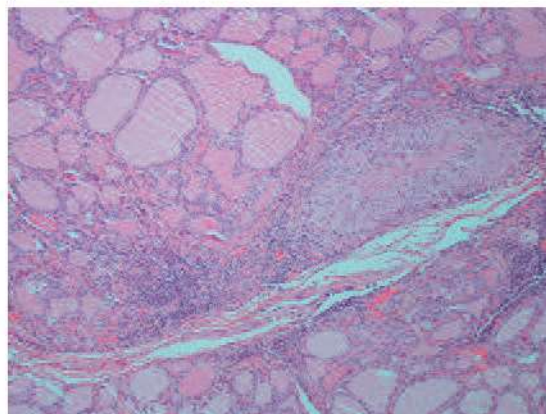


FIGURA 3: Granuloma epitelióide com necrose caseosa central



(V.R.: 2-4,4 pg/mL), TRAbs 16,9 U/L (V.R.: < 1,5 U/L). Eco cervical sobreponível à anterior, nomeadamente sem evidência de adenopatias.

A doente foi proposta para terapêutica definitiva, tendo-se optado pela tireoidectomia total. O exame histológico da peça operatória mostrou: “aspectos típicos da doença de Graves e dois granulomas com necrose caseosa central”. A pesquisa de microorganismos por métodos histoquímicos foi negativa (fig. 2 e fig. 3).

Nesta altura, foi encetada marcha diagnóstica no sentido de avaliação de infecção sistémica: prova tuberculínica 12 mm, teleradiografia do tórax sem alterações pleuroparenquimatosas, exame directo (Ziehl-Neelsen), PCR e culturas de expectoração, urina e sangue negativas para *Mycobacterium tuberculosis*, VS 14 mm/1<sup>ª</sup>h, ecografia abdominal sem alterações.

Foi, portanto, estabelecido o diagnóstico de tuberculose tiroideia, sem evidência de envolvimento sistémico.

A doente foi tratada com antibacilares durante nove meses.

## COMENTÁRIO

Embora a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* seja relativamente frequente e possa localizar-se em qualquer órgão do organismo, o envolvimento da glândula tiroideia é raro e a sua real incidência é desconhecida. Postula-se que a glândula seja relativamente resistente a esta infecção<sup>6</sup>. Esta “resistência” dever-se-á à acção bactericida do material colóide, ao elevado fluxo sanguíneo condicionador de um ambiente altamente oxigenado e finalmente à alta concentração de iodo<sup>7</sup>. É mais frequente em mulheres de meia-idade<sup>8</sup>.

A tuberculose tiroideia pode ocorrer no contexto de doença sistémica ou a glândula pode estar infectada de forma isolada<sup>3,9-10</sup>. Na nossa doente não foi identificada infecção em qualquer outra localização.

Na série publicada por Ozekinci *et al*<sup>11</sup> onde os autores reviram mais de 800 peças de tireoidectomia, são descritos os aspectos fundamentais e específicos da histologia da tuberculose tiroideia, que encontramos na nossa doente – necrose caseosa com granulomas. Nesta mesma série, em cinco doentes foi diagnosticada tuberculose tiroideia apenas no exame histológico, à semelhança do que aconteceu na nossa doente.

A forma mais frequente de apresentação da tuberculose tiroideia é sob a forma de nódulo tiroideu isolado mas outras formas de apresentação como tirotoxicose, bócio difuso, abscesso tiroideu e mesmo hipotireoidismo, já foram descritas<sup>10</sup>. O seu diagnóstico é difícil e só raramente é considerado pré-operatoriamente, sobretudo em doentes sem evidência de doença sistémica<sup>5</sup>.

Da revisão da literatura, não encontramos outros casos de tuberculose tiroideia em doente com doença de Graves. Embora as manifestações clínicas da tuberculose tiroideia possam assemelhar-se às do hipertireoidismo, o quadro clínico e os achados bioquímicos e histológicos descritos na nossa doente são inequivocamente diagnósticos de doença de Graves, o que o torna especialmente invulgar. Acreditamos que, neste caso, o diagnóstico de tuberculose tiroideia foi incidental na análise histológica da tiroideia, mas permitiu que a terapêutica específica fosse instituída.

Parece-nos importante considerar este diagnóstico na avaliação histológica de uma peça de tireoidectomia, mesmo na ausência de quadro de infecção sistémica, sobretudo em países com alta prevalência de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e em doentes pertencentes a grupos de risco.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Relatório do Observatório Nacional das Doenças respiratórias 2009, Portugal.
2. Kang M, Ojili V, Khandelwal N, Bhansali A. Tuberculous abscess of the thyroid gland: a report of two cases. *J Clin Ultrasound* 2006; 34: 254-7.
3. Tan KK. Tuberculosis of the thyroid gland – a review. *Ann Acad Med Singapore*. 1993; 22(4): 580-2.
4. Bradley Paulino da Silva, Eurico Gurgel Amorim, Elizabeth João Pavin, Antonio Santos Martins, Patrícia Sabino de Matos, Denise Engelbrecht Zantut. Wittmann. Primary thyroid tuberculosis: a rare etiology of hypothyroidism and anterior cervical mass mimicking carcinoma. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009 53/4
5. Andrius Simkus. Thyroid tuberculosis. *Medicina* 2004; 40: 201-4.
6. Barnes P, Weatherstone R. Tuberculosis of the thyroid gland: two case reports. *Br J Chest* 1979; 73: 187-91.
7. Madhusudhan KS, Seith A, Khadgawat R, Das P, Mathur S. Tuberculosis of the thyroid gland: magnetic resonance imaging appearances. *Singapore Med J*. 2009 50(7): 235-8.
8. Abdulsalam F, Abdulaziz S, Mallik A, 2005 Primary Tuberculosis of the Thyroid Gland. *KMJ* 37: 116-118.
9. E Bulbuloglu, H Ciralik, E Okur, G Ozdemir, F Ezberci, A Cetinkaya. Tuberculosis of the thyroid gland: review of the literature. *World Journal of Surgery*, vol 30, 2, 149-55; 2006.
10. Ines Zendah, Hafaoua Daghfous, Sonia Bem Mrad, Fatma Tritar. Primary tuberculosis of the thyroid gland. *Hormones*. 2008; 7 (4): 330-3
11. Ozekinci S, Mizrak B, Saruhan G, Senturk S. Histopathologic diagnosis of thyroid tuberculosis. *Thyroid* 2009 Sep; 19(9):983-6.

# Hiperplasia Congénita da Supra-renal: quando o mesmo genótipo tem diferentes fenótipos...

## *Congenital adrenal hyperplasia: when the same genotype have different phenotypes...*

Carolina Cordinhã<sup>2</sup>, Sofia Morais<sup>2</sup>, Rita Cardoso<sup>1</sup>, Lina Ramos<sup>3</sup>, Adelaide Taborda<sup>2</sup>,  
Alice Mirante<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital Pediátrico de Coimbra

<sup>2</sup> Serviço de Neonatologia, Maternidade de Bissaya Barreto – Coimbra

<sup>3</sup> Serviço de Genética Médica do Hospital Pediátrico de Coimbra

Correspondência: Carolina Cordinhã › Hospital Pediátrico de Coimbra › Avenida Afonso Romão › Santo António dos Olivais › 3000-602  
COIMBRA carolinacordinha@gmail.com

### RESUMO

A hiperplasia congénita da supra-renal (HCSR) engloba um grupo de patologias de transmissão autossómica recessiva, resultantes da deficiência de uma de cinco enzimas, necessárias para a esteroidogénese no córtex supra-renal. Podem considerar-se duas formas principais: a forma clássica (que inclui as formas perdedora de sal e virilizante simples) e a forma não clássica.

Os autores descrevem o caso de uma menina com diagnóstico pré-natal de HCSR. A irmã, actualmente com cinco anos de idade, apresenta o diagnóstico de HCSR forma virilizante simples, efectuado aos 3 anos de idade por virilização dos genitais externos. O estudo molecular efectuado confirmou a presença em heterozigotia composta das mutações patogénicas g.999T>A e g.1762\_1763insT do gene CYP21A2 compatível com deficiência de 21-hidroxilase (associada mais frequentemente à forma virilizante simples).

A gravidez actual foi vigiada, tendo a mãe iniciado terapêutica com dexametasona oral às 8 semanas de gestação. O estudo molecular efectuado por amniocentese às 16 semanas de idade gestacional, confirmou a presença das mutações anteriormente descritas num feto com cariótipo 46, XX, pelo que a mãe manteve terapêutica até ao final da gravidez.

O parto foi eutócico às 38 semanas, e o recém-nascido apresentava genitais externos de configuração feminina normal. Nas primeiras horas de vida, apresentou um quadro clínico de sépsis, pelo que iniciou antibioterapia endovenosa e hidrocortisona 30mg/m<sup>2</sup>/dia. Ao 11º dia de vida apresentou hiponatremia acompanhada de hipercalemia pelo que iniciou terapêutica com fludrocortisona (50 µg/dia) e suplemento oral de sódio. A evolução clínica foi favorável, com melhoria franca do estado geral e recuperação ponderal progressiva.

A crise adrenal pode ocorrer nas formas virilizantes simples, em que existe um menor compromisso da actividade enzimática, nomeadamente da produção de aldosterona. Neste caso o factor desencadeante foi a sépsis neonatal.

### PALAVRAS-CHAVE

Hiperplasia Congénita da Supra-renal; Défice de 21-hidroxilase; Perda de sal; Diagnóstico pré-natal.

**ABSTRACT**

*Congenital adrenal hyperplasia (CAH) represents a group of autosomal recessive disorders resulting from the deficiency of one out of five enzymes of adrenal steroidogenesis. There are two main clinical varieties: the classic (including the salt-losing and simple virilizing) and the non-classic variety.*

*The authors present the clinical case of a girl with prenatal CAH diagnosis. Her five year old sister, had a CAH diagnosis (a simple virilizing form) done at the age of three years because of signs of virilization. The genetic testing revealed two pathogenic mutations g.999T>A and g.1762\_1763insT of CYP21A2 gene most frequently associated with the simple virilizing form of the disease.*

*This was an uneventful pregnancy and the maternal dexamethasone therapy was initiated at 8 weeks of gestation. The prenatal diagnosis confirmed the presence of the same mutations in the fetus with a 46, XX karyotype and the treatment was maintained till the end of the pregnancy.*

*The child was born at 38 weeks with normal feminine external genitalia. In the first few hours presented with clinical signs of sepsis being treated with antibiotics and hydrocortisone 30mg/m<sup>2</sup> per day. On day eleven because she presented with hyponatremia and hyperkalemia fludrocortisone (50 µg per day) and sodium were added. The clinical evolution was favorable.*

*The adrenal crisis can happen in the simple virilizing forms under stress which was the case of the neonatal sepsis in our girl.*

**KEY-WORDS**

*Congenital adrenal hyperplasia; 21-Hydroxylase deficiency; Salt-losing; Prenatal diagnosis.*

**INTRODUÇÃO**

A hiperplasia congénita da supra-renal (HCSR) engloba um grupo de patologias de transmissão autossómica recessiva, resultantes da deficiência de uma de cinco enzimas, necessárias para a esteroidogénese no córtex supra-renal. A forma mais frequente resulta do défice de 21-hidroxilase e é responsável por mais de 90% dos casos<sup>1</sup>.

Esta enzima é responsável pela conversão de 17-hidroxiprogesterona (17HOP) em 11-desoxicortisol - precursor do cortisol, e pela conversão da progesterona em desoxicorticosterona - precursor da aldosterona. Assim, este défice enzimático resulta na diminuição da síntese do cortisol, que por um mecanismo de feed-back negativo do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal origina um aumento da secreção de hormona libertadora de corticotrofina (CRH) e de cor-

ticotrofina (ACTH) com consequente estimulação da supra-renal. A hiperplasia supra-renal resultante conduz à acumulação de precursores de cortisol, imediatamente anteriores ao bloqueio, com desvio para a via de produção dos esteróides sexuais com aumento dos androgénios.

A produção de aldosterona poderá estar mais ou menos comprometida, consoante o grau de deficiência de 21-hidroxilase, resultando assim num espectro clínico de gravidade variável. Podem considerar-se duas formas principais: a forma clássica (que inclui formas perdedora de sal e virilizante simples) e a forma não clássica<sup>1,3</sup>.

A forma clássica é um dos distúrbios hereditários mais comuns, com uma incidência global estimada de 1:16000 nados vivos, variável de acordo com a raça e área geográfica<sup>1,3</sup>. Esta forma é a mais grave e cursa com ambiguidade sexual no recém-

nascido (RN) do sexo feminino; a produção androgénica excessiva condiciona graus variáveis de virilização *in utero*, desde simples clitoromegália a genitais externos fenotipicamente masculinos<sup>3</sup>. Nos RN do sexo masculino, os genitais externos não são geralmente afectados, embora possa verificar-se hiperpigmentação escrotal ou aumento das dimensões do pénis.

Cerca de 75% dos pacientes com a forma clássica têm uma produção inadequada de aldosterona (formas com perda de sal). Esta deficiência de mineralocorticoide manifesta-se habitualmente como uma crise perdedora de sal, entre a primeira e a terceira semanas de vida, embora a hipercalemiemia isolada possa já estar presente entre o terceiro e o quinto dia e a hiponatremia entre o quarto e o sétimo dia de vida. Clinicamente caracteriza-se por um quadro de náuseas, vômitos, anorexia, letargia, choro fraco, dificuldades alimentares, má evolução ponderal e desidratação, podendo ocorrer hipotermia, arritmias, hipotensão e choque. Analiticamente caracteriza-se por hiponatremia, hipercalemiemia, hipoglicemia e acidose metabólica<sup>1,3</sup>.

Além das formas perdedoras de sal, a crise adrenal pode ocorrer na forma virilizante simples, em que existe um menor compromisso da actividade enzimática, nomeadamente da produção de aldosterona. Esta situação poderá ocorrer em situações de stress (infecção, febre, diminuição da ingestão de sal).

A forma não clássica, menos severa é de apresentação mais tardia, fora do período neonatal. Manifesta-se por sinais de excesso de androgénios mas sem ambiguidade genital no RN. Na infância pode ser causa de puberdade precoce (com aceleração do crescimento e avanço da idade óssea), podendo comprometer a estatura final pelo encerramento epifisário prematuro. Em adolescentes e em mulheres adultas pode ser responsável por hirsutismo, acne, irregularidades menstruais e infertilidade sendo que alguns indivíduos afectados permanecem assintomáticos<sup>2,3</sup>.

A anomalia bioquímica característica da forma clássica de HCSR é o aumento dos níveis séricos de 17HOP.

O gene responsável pela deficiência em 21-hidroxilase (*CYP21*) está localizado em 6p21.3. sendo que próximo do gene funcional localiza-se um pseudogene (*CYP21P* ou *CYP21A*) com variadas mutações, incompatíveis com uma normal expressão do gene; esta disposição genómica particular e o elevado grau de homologia entre os dois genes (superior a 90%) predis põe a mutações do gene funcional por conversão génica ou por deleção no contexto de recombinação homóloga e *crossing-over* desigual<sup>1-3</sup>.

Existe uma boa correlação genótipo - fenótipo nas formas mais graves, o que pode não acontecer nas restantes, não sendo por isso fácil predizer o fenótipo a partir da mutação específica identificada.

A terapêutica com glicocorticóides tem como objectivos reduzir a hipersecreção de CRH, ACTH e androgénios, optimizando dessa forma o crescimento e permitir uma maturação sexual normal protegendo a capacidade reprodutora.

Pela semi-vida curta e efeito supressor do crescimento mínimo, a droga de escolha na infância é a hidrocortisona oral 15-25 mg/m<sup>2</sup>/dia, dividida em três tomas diárias. Em situações de stress ligeiro a moderado (febre) a dose de manutenção deve ser duplicada ou triplicada<sup>1,3,5-8</sup>.

A terapêutica com mineralocorticoide, apesar de geralmente desnecessária durante o tratamento com doses de stress de hidrocortisona revela-se benéfica nas formas com e sem perda de sal, ao reduzir os níveis de ACTH e as necessidades de glicocorticoide. A droga de escolha é a fludrocortisona 0,05 a 0,3 mg/dia<sup>1,3,5-8</sup>. Quando se confirma perda de sal, a reposição com suplementos de cloreto de sódio é mandatória nos primeiros dois anos de vida (1-3 g/dia, equivalente a 17-51 mEq/dia)<sup>1,3,5-8</sup>.

A avaliação da terapêutica é efectuada pela monitorização dos níveis séricos de ACTH, 17HOP, DHEA, androstenediona e

actividade da renina plasmática.

A abordagem destas situações requer a intervenção de uma equipa multidisciplinar experiente (Endocrinologista Pediátrico, Geneticista e nas situações de ambiguidade sexual Cirurgião/Urologista Pediátrico e Psicólogo), não só pela complexidade que comportam como pela envolvência psicossocial e cultural, que geralmente condiciona interferência significativa na dinâmica familiar.

Os autores descrevem o caso clínico de um RN com diagnóstico pré-natal de HCSR, com genótipo semelhante ao da irmã mas com diferente manifestação fenotípica.

## CASO CLÍNICO

Apresenta-se o caso clínico de um RN do sexo feminino, fruto da segunda gestação de um casal jovem e não consanguíneo, cuja irmã, actualmente com cinco anos de idade, apresenta o diagnóstico de HCSR forma virilizante simples, efectuado aos três anos de idade por virilização dos genitais externos. O estudo molecular efectuado confirmou a presença em heterozigotia composta das mutações patogénicas g.999T>A e g.1762\_1763insT no gene *CYP21A2* compatível com deficiência de 21-hidroxilase (associada mais frequentemente à forma virilizante simples). Foi submetida a clitoroplastia de redução e vulvovaginoplastia aos quatro anos.

A gravidez actual foi vigiada, tendo a mãe iniciado terapêutica com dexametasona oral às 8 semanas de gestação. As serologias foram negativas e as ecografias pré-natais foram descritas como normais. O estudo molecular efectuado por amniocentese às 16 semanas confirmou a presença das mutações anteriormente descritas num feto com cariótipo 46, XX, pelo que a mãe manteve terapêutica até ao final da gravidez.

O parto foi eutócico, às 38 semanas de gestação sem referência a factores de risco infeccioso perinatal. Nasceu hipotónica,

mas sem necessidade de reanimação e com somatometria adequada à idade gestacional (peso: 3785g (P<sub>75</sub>), comprimento: 51 cm (P<sub>75</sub>) e perímetro craniano: 37,5 cm (P<sub>90-95</sub>). Apresentava genitais externos de configuração feminina normal, sem qualquer sinal de virilização.

Foi internada às oito horas de vida na Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais (UCIN) por quadro de hipotonia, dificuldades nas mamadas e hipoglicémia (glicémia capilar: 40 mg/dL).

À entrada na UCIN constatada febre (temperatura axilar 38°C), estando hemodinamicamente estável. Encontrava-se hipotónica, com choro débil e com fraca mobilidade espontânea mas reactiva à manipulação. Ao exame objectivo verificou-se ainda palidez cutânea, gemido e polipneia por períodos, com auscultação pulmonar normal. Analiticamente apresentava PCR de 2,3 mg/dL, com hemograma e ionograma sem alterações significativas (Quadro I). Foi instituída antibioterapia com Ampicilina (100 mg/Kg/dia) e Gentamicina (4 mg/Kg/dia) e iniciou terapêutica com hidrocortisona 30 mg/m<sup>2</sup>/dia.

QUADRO I: Evolução analítica em função dos dias de vida.

	D1	D2	D4	D9	D11
Glicose (mmol/L)	1.9	3.8	3.6		4.1
Ureia (mmol/L)	2.9	2.9	3.0	4.0	5.4
Creatinina (mmol/)	86	90	55	52	58
Na+ (mmol/L)	138	141	146	133	131
K+ (mmol/L)	Hemolisada	4.3	4.1	5.8	5.9

Verificou-se uma estabilização cardiorrespiratória progressiva (FiO<sub>2</sub> máx 23-25% para SpO<sub>2</sub> ≥ 92% apenas nas primeiras sete horas de internamento). Iniciou alimentação enteral no segundo dia de vida, com boa tolerância mas manteve dificuldades alimentares com fraca sucção, associada a perda ponderal (peso mínimo aos sete dias de 3390g, menos 10% do peso de nascimento).

Cumpriu oito dias de antibioterapia

tendo sido a hemocultura negativa. Ao nono dia de vida a avaliação analítica revelou sódio 133 mmol/L e potássio 5,8 mmol/L. Atendendo ao ganho ponderal insuficiente e à subida da caliémia, foi colocada a hipótese de se tratar de uma forma clássica de HCSR perdedora de sal. A D11 verificou-se hiponatremia (sódio 131 mmol/L), com cortisol baixo, 17OHP, testosterona e androstenediona aumentadas e aumento da actividade da renina plasmática (Quadro II).

QUADRO II: Evolução dos doseamentos hormonais com referência aos valores normais.

	D2	D11	D26	D66
17OHP (ng/mL) N: 7-77		240	18,3	1,82
Testosterona Total (ng/dL) N: 20-64		95.1	<20	---
Androstenediona (ng/mL) N: 0.2-2.9		9.5	1,0	<0,3
DHEA-504 (µg/dL) N: 5-111		20.8	<15	<15
ACTH (pg/mL) N: 10-60	50.2	52.1	21.4	10
Renina activa (µUI/mL) N: 4.4-46.1	267	> 500	> 1000	> 2500

Iniciou então terapêutica com fludrocortisona (50 µg/dia) e suplemento oral de sódio (11 mEq/Kg/dia). A evolução clínica foi favorável, com melhoria franca do estado geral e recuperação ponderal progressiva. Teve alta para o domicílio aos 18 dias de vida, sob terapêutica com hidrocortisona, fludrocortisona e NaCl, a mamar ao seio materno de forma competente e com peso semelhante ao peso de nascimento.

Nas consultas de seguimento tem apresentado boa evolução ponderal com ionograma sérico e doseamentos hormonais adequados.

## DISCUSSÃO

A HCSR é a causa mais comum de ambiguidade sexual. A avaliação do RN com ambiguidade genital deve ser tão precoce

quanto possível, dada a necessidade de diagnosticar atempadamente HCSR, entidade clínica potencialmente fatal nas formas perdedoras de sal.

O diagnóstico pré-natal deve ser oferecido aos casais identificados como heterozigotos. Nestes casos, apesar de ainda ser controverso, pode ser oferecido o tratamento à mulher grávida com dexametasona, devendo ser iniciado o mais precocemente possível (sempre antes das 10 semanas e preferencialmente antes das sete a oito semanas de gestação), de forma a suprimir a produção androgénica fetal, impedindo a virilização fetal<sup>1,3-7</sup>. No entanto, a segurança do tratamento a longo prazo não está completamente estabelecida, devendo ter-se em consideração os potenciais efeitos adversos da terapêutica para a mãe (aumento excessivo de peso, estrias, edema, Síndrome de Cushing) e para o feto (aborto espontâneo, morte fetal tardia, restrição de crescimento intra-uterino, esteatose hepática, sépsis, má progressão ponderal pós-natal, hidrocefalia, agenesia do corpo caloso, atraso do desenvolvimento, dificuldades de aprendizagem)<sup>1,3-7</sup>.

A maternidade central em que foi seguida a gravidez do nosso caso clínico efectua este tipo de terapêutica, sendo oferecida aos pais a possibilidade de determinação do sexo fetal no sangue periférico após as 8 semanas. A terapêutica é descontinuada se o feto for do sexo masculino. O diagnóstico molecular é feito por biópsia de vilosidades coriônicas ou amniocentese e a confirmação do défice de 21-hidroxilase implica a continuação do tratamento até ao final da gravidez nos fetos do sexo feminino.

A família descrita é paradigmática em diversos aspectos respeitantes ao diagnóstico e abordagem da HCSR por défice de 21-hidroxilase.

A presença de um caso índice permitiu a realização do tratamento e diagnóstico pré-natal acima descritos com bons resultados para a nossa doente (impedindo a virilização fetal) o que se verifica em cerca de 70 a

85% dos fetos femininos afectados<sup>3-7</sup>.

No entanto os autores discutem se a ocorrência de sépsis neste caso poderá estar associada à corticoterapia prévia.

Este caso é também ilustrativo da variabilidade de expressão fenotípica da doença, dada a não correlação entre as manifestações clínicas e as mutações em causa. Assim, e apesar do mesmo diagnóstico molecular em ambas as irmãs (compatível com a forma virilizante simples), o quadro clínico foi distinto. Como já anteriormente descrito na literatura, pretendemos com este caso clínico salientar o facto da crise adrenal poder ocorrer nas formas virilizantes simples em situações de stress e que neste caso o factor desencadeante foi a sépsis neonatal.

É fundamental que, para além de manter uma vigilância clínica e laboratorial cuidadosas dos pacientes, se faça a confirmação molecular nos mesmos e se realize estudos de heterozigotia nos progenitores e familiares em risco que permita um aconselhamento genético adequado e opções reprodutivas. Principalmente em países que, tal como Portugal, não efectuam rastreio neonatal desta patologia o conhecimento antecipado do risco de recorrência é muito importante<sup>1-3,6</sup>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Speiser PW, White PC. Congenital Adrenal Hyperplasia. *N Engl J Med* 2003; 349:776-88
2. Merke DP. Genetics and clinical presentation of classic congenital adrenal hyperplasia due to CYP21A2 (21-hydroxylase) deficiency. Acessível em [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com). Last update data: Janeiro 2008
3. Antal Z, Zhou P. Congenital adrenal hyperplasia: diagnosis, evaluation, and management. *Pediatrics in Review*. 2009;30:e49-e57.
4. Merke DP. Diagnosis of classic congenital adrenal hyperplasia due to CYP21A2 (21-hidroxilase) deficiency. Acessível em [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com). Last update data: Outubro 2007
5. Merke DP. Treatment of classic congenital adrenal hyperplasia due to CYP21A2 (21-hydroxylase) deficiency in infants and children. Acessível em [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com). Last update data: Abril 2008
6. Joint LWPES/ESPE CAH working group. Consensus statement on 21- Hydroxylase Deficiency from the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and The European Society for Paediatric Endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(9):4048-4053
7. American Academy of Pediatrics: Section on Endocrinology and Committee on Genetics. Technical Report: Congenital Adrenal Hyperplasia. *Pediatrics* 2000;106(6):1511-1518
8. Houk CP, Levitsky LL. Management of the infant with ambiguous genitalia. Acessível em [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com). Last update data: Fevereiro 2008
9. Study of a kindred with Classic Congenital Adrenal Hyperplasia: diagnostic challenge due to phenotypic variance. Chin D et al. *J Clin Endocrinol Metab*. 83 (6): 1940-45.
10. Wedell A, Thilen A, Ritzen EM, Stengler B, Luthman H. 1994 Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *J Clin Endocrinol Metab*.78: 1145-1152.
11. Wilson RC, Mercado AB, Cheng KC, New MI. 1995 Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*.80: 2322-2329.
12. Bormann M, Kochhan L, Knorr D, Bidlingmaier F, Olek K. 1992 Clinical heterogeneity of 21-hydroxylase deficiency of sibs with identical 21-hydroxylase genes. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 126:7-9.

# Hepatic glycogenosis as a cause of hepatomegaly in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus

## *Glicogenose hepática: causa de hepatomegália em crianças e adolescentes com diabetes mellitus tipo 1*

Tânia Russo<sup>1</sup>, Bruno Arroja<sup>2</sup>, Cristina Amado<sup>3</sup>, Filipe Silva<sup>4</sup>, Ester Gama<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Interna da Formação Específica em Pediatria, Serviço de Pediatria, Hospital de Santo André, EPE, Leiria, Portugal

<sup>2</sup> Interno da Formação Específica em Gastreterologia, Serviço de Gastreterologia, Hospital de Santo André, EPE, Leiria, Portugal

<sup>3</sup> Assistente Graduada do Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Santo André, EPE, Leiria, Portugal

<sup>4</sup> Assistente Hospitalar do Serviço de Gastreterologia, Hospital de Santo André, EPE, Leiria, Portugal

<sup>5</sup> Assistente Graduada do Serviço de Pediatria, Hospital de Santo André, EPE, Leiria, Portugal

Correspondência: Tânia Russo › Av. Dr. Fernando Ricardo Ribeiro Leitão, 13-1º Direito Massamá 2745-772 QUELUZ › Portugal › [tania.russo@gmail.com](mailto:tania.russo@gmail.com)

### SUMMARY

Secondary hepatic glycogenosis is an underrecognized complication of long-standing type 1 diabetes. It has been described as the first cause of hepatomegaly in children and adolescents with type 1 diabetes and poor metabolic control. It must be distinguished from other causes of hepatomegaly and elevated liver enzymes such as nonalcoholic fatty liver disease. The authors report the case of a fifteen-year-old male with type 1 diabetes for 4 years and not compliant to treatment who presented with hepatomegaly and elevated liver enzymes. Other possible causes were excluded. Liver biopsy confirmed periodic acid-Schiff-positive deposits of glycogen in cytoplasm and nuclei. During follow-up, a correlation between better metabolic control and reduction in liver size and enzyme levels has been shown. In most cases secondary glycogenosis is reversible with adequate glycemic control. The performance of liver biopsy remains a matter of controversy.

### KEY-WORDS

*Glycogenosis; Glycogen; Diabetes mellitus type 1; Hepatomegaly; Child.*

### RESUMO

A glicogenose hepática secundária é uma complicação subdiagnosticada da diabetes mellitus tipo 1 de longa duração. É descrita como primeira causa de hepatomegália em crianças e adolescentes com diabetes mellitus tipo 1 de longa duração e mau controlo metabólico. Deve ser diferenciada de outras causas de hepatomegália e elevação das enzimas hepáticas, como esteatose hepática não alcoólica. Os autores descrevem o caso de um rapaz de 15 anos com diabetes tipo 1 com 4 anos de evolução e má adesão à terapêutica, que surgiu com hepatomegália e elevação das enzimas hepáticas. Foram excluídas outras causas possíveis. A biópsia hepática confirmou a presença de depósitos citoplasmáticos e intranucleares de glicogénio positivos na coloração por PAS (*periodic acid-Schiff*). Verificou-se correlação entre períodos de melhor controlo metabólico e diminuição das dimensões hepáticas e dos níveis enzimáticos. A



glicogenose hepática secundária é reversível mediante controlo glicémico adequado. A indicação para realização de biópsia hepática não é consensual.

#### PALAVRAS-CHAVE

Glicogenose; Glicogénio; Diabetes mellitus tipo 1; Hepatomegália; Crianças.

#### ABBREVIATIONS

*DM, diabetes mellitus; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; HbA1c, glycosylated hemoglobin fraction; LDL, low-density lipoprotein; BMI, body mass index; MDI, multiple daily injections; NPH, neutral protamine Hagedorn; AST, aspartate transaminase; ALT, alanine transaminase; GGT, gamma-glutamyl transferase; PAS, periodic acid-Schiff.*

## INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is a systemic disease which may cause several hepatic changes. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which comprises steatosis and steatohepatitis (NASH), occurs mostly in type 2 diabetes and is associated with obesity and insulin resistance<sup>1-5</sup>. Secondary hepatic glycogenosis has been considered a rare condition; yet, it has been described as the first cause of hepatomegaly in children and adolescents with poorly controlled long-standing type 1 diabetes, although it can also occur in patients with type 2 diabetes<sup>1-3,6,7</sup>. The importance of distinguishing between NAFLD and secondary glycogenosis is that the former may progress to irreversible fibrosis and cirrhosis, whereas the latter has a better prognosis, being reversible upon optimization of glycemic control<sup>1-7</sup>.

We report the case of a 15 year-old male with poorly controlled type 1 diabetes who presented with hepatomegaly and elevated transaminases.

## CASE REPORT

A 15-year-old boy with type 1 DM presented at one of his regular visits at our hospital with hepatomegaly extending 3 cm

below the right costal margin and elevated transaminases. Diabetes had been diagnosed at the age of eleven, but soon after the diagnosis he started to evidence poor glycemic control [glycosylated hemoglobin fraction (HbA1c) 8,2-11,0%] with frequent episodes of hyperglycemia. He often skipped insulin administrations and needed high doses of insulin due to excessive food intake. Three years after diagnosis, his blood tests revealed hyperlipidemia for the first time [total cholesterol 232 mg/dL, low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol 104 mg/dL and triglycerides 443 mg/dL].

The patient referred no symptoms and had no history of alcohol or narcotic abuse or regular use of any other medication besides insulin. The family history was unremarkable. He appeared well nourished, his weight was 66 kg (75th percentile), the height was 169,5 cm (between 25th and 50th percentiles) and the body mass index (BMI) was 23,0 kg/m<sup>2</sup> (between 75th and 85th percentiles). He had a normal pubertal development. There were no other remarkable findings on physical examination.

By then, he was on multiple daily injections (MDI) treatment with premeal lispro insulin and neutral protamine Hagedorn (NPH) insulin before breakfast and before supper (insulin sensitivity factor 15 mg/dL, insulin-to-carbohydrate ratio 3 U/1 exchange) at a total dose of 1,4 U/kg/day.

On laboratory examination, complete blood count was normal and transaminases were elevated [aspartate transaminase (AST) 343 U/L, alanine transaminase (ALT) 384 U/L]; HbA1c was 10,8%. Abdominal ultrasound demonstrated enlarged liver with regular contour and homogeneously reflective echostructure, suggesting moderate steatosis, and also homogenous splenomegaly.

Because of persistence of poor metabolic control (in spite of insulin treatment with 1,7 U/kg/day), hepatomegaly and further rise of transaminases (AST 1236 U/L, ALT 925 U/L), he was admitted in our Pediatric ward for investigation and optimization of glycemic control, with collaboration of the Gastroenterology Department. The following hypotheses were considered: non-alcoholic steatohepatitis (NASH), hepatitis (viral or autoimmune) and metabolic or infiltrative hepatic disease. Liver function tests except for transaminases and gamma-glutamyl transferase (GGT) were within reference range (Tables I and II). Viral serologies and autoimmunity antibodies were negative (Table II). Metabolic disorders such as hemochromatosis, Wilson's disease and alpha-1 antitrypsin deficiency were ruled out (Table II).

Subsequent diagnostic work-up included an abdominal ultrasound with Doppler that gave no additional information, and a percutaneous liver biopsy which showed moderate to severe homogenous macrovesicular steatosis (60-70%) without fibrosis and a large number of hepatocytes with periodic acid-Schiff (PAS)-positive intranuclear glycogen deposits (Figure 1). Hepatic copper was within normal range (9,0 µg/g of dry liver; reference range <50 µg/g). At this point hepatic glycogenosis secondary to poor glycemic control was the most likely diagnosis.

Under a tight control of food intake and supervised insulin treatment, there was a gradual improvement of glycemic values with lower insulin dose requirement and reduction of lipid and liver enzymes levels (Table I). Hepatomegaly decreased progressively until it was no longer detected on

TABLE I: Evolution of laboratory tests performed during first hospital admission, demonstrating reduction of the levels of liver enzymes and lipids.

	AST (U/L)	ALT (U/L)	GGT (U/L)	Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)
Day 1	541	549	NP	NP	NP
Day 5	426	503	290	252	296
Day 9	175	291	235	178	152
Reference range	10 – 47	14 – 72	15 – 73	<201	35 – 160

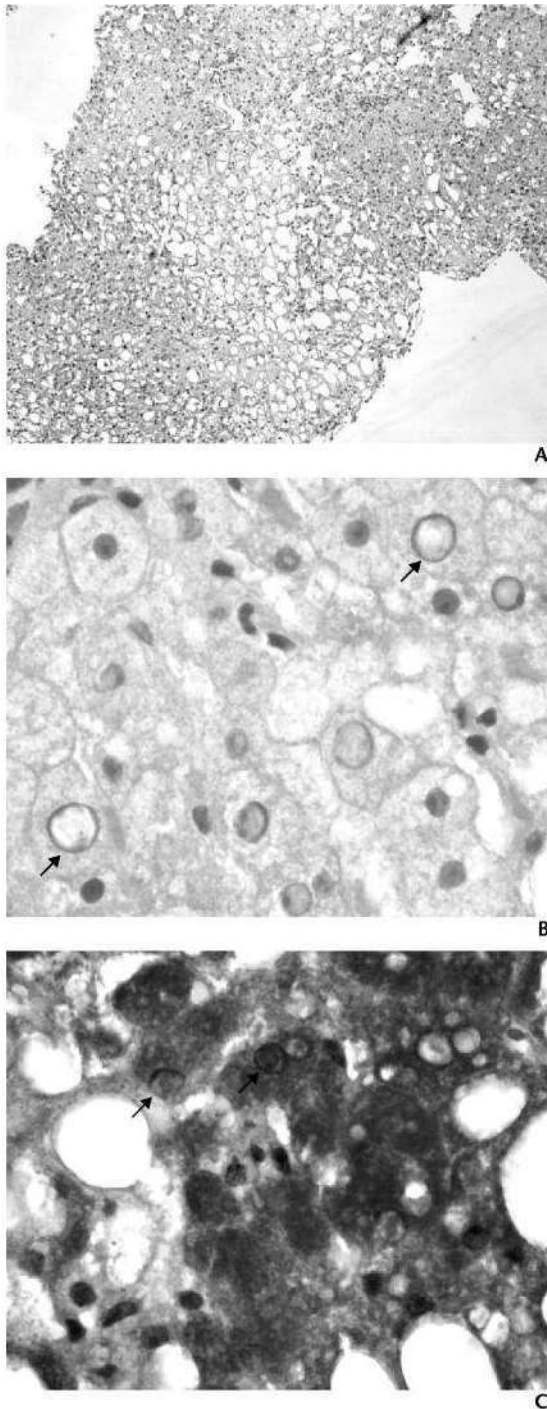
AST – aspartate transaminase; ALT – alanine transaminase; GGT – gamma-glutamyl transferase; Chol – total cholesterol; TG – triglycerides; NP – not performed.

TABLE II: Results of laboratory investigations.

	Results	Reference range
<b>Liver tests</b>		
ALP (U/L)	155	130 - 525
Total bilirubin (µmol/L)	11	0 - 24
Albumin (g/dL)	4,7	3,9 – 5,0
Prothrombin time (sec)	11,45	C = 13,35
<b>Viral serologies</b>		
HAV, HBV, HCV	Negative	
EBV, CMV, HSV 1 and 2	Negative for acute infection	
<b>Autoimmunity tests</b>		
ANA	Negative	
ASMA	Negative	
Anti-LKM antibody	Negative	
Anti-LC1 antibody	Negative	
SLA	Negative	
AMA	Negative	
<b>Other tests</b>		
Lactic acid (mmol/L)	2,3	0,7 – 2,1
Ammonia (µmol/L)	4	9 – 33
Alpha-1 AT (mg/dL)	99	93 – 220
Copper, serum (µg/dL)	143	70 – 140
Copper, urine (µg/L)	8,6	2,0 – 80,0
Ceruloplasmin (mg/dL)	50	22 – 58
Iron (µmol/L)	25,9	8,8 – 32,4
Ferritin (ng/mL)	242	20 – 250
TIBC (µmol/L)	66,9	46,8 – 82,7
Transferrin saturation (%)	38,7	20,0 – 50,0

ALP – alkaline phosphatase; C – control; HAV – hepatitis A virus; HBV – hepatitis B virus; HCV – hepatitis C virus; EBV – Epstein-Barr virus; CMV – cytomegalovirus; HSV – herpes simplex virus; ANA – antinuclear antibody; ASMA – anti-smooth muscle antibody; LKM – liver-kidney microsomal; LC1 – liver cytosol 1; SLA – soluble liver antigen; AMA – anti-mitochondrial antibody; Alpha-1 AT – alpha-1 antitrypsin; TIBC – total iron binding capacity.

FIGURE 1: Liver histology. (A) Macrovesicular steatosis (hematoxylin and eosin). (B) Enlarged nuclei (arrows) with peripherally displaced material suggesting accumulation of substance inside (hematoxylin and eosin). (C) Abundant cytoplasmic and nuclear (arrows) glycogen deposits demonstrated by periodic acid-Schiff stain.



physical examination on the 9th day after admission. He was discharged home on the 12th day after admission.

Since the diagnosis, the patient has had periods of reasonable metabolic control

TABLE III: Laboratory test results during follow-up in the period of best and worst metabolic control (respectively 12 and 18 months after onset of symptoms). There is correlation between lower HbA1c and lower levels of liver enzymes.

	Best control	Worst control
HbA1c (%)	8,8	10,2
AST (U/L)	133	929
ALT (U/L)	175	1384
GGT (U/L)	168	783

HbA1c – glycosylated hemoglobin fraction; AST – aspartate transaminase; ALT – alanine transaminase; GGT – gamma-glutamyl transferase.

interspersed with others of poor metabolic control, in spite of optimization of insulin treatment (insulin glargine as basal insulin and lispro as premeal insulin, instituted seven months after initial signs), which he is still not compliant to. Those periods of better glycemic control are accompanied by reduction in liver size and liver enzyme levels (Table III), although maintaining palpable hepatomegaly and hepatic steatosis pattern on abdominal ultrasound.

## DISCUSSION

Secondary hepatic glycogenosis is characterized by accumulation of glycogen in the cytoplasm and nuclei of hepatocytes. It is associated with long-standing type 1 DM and poor metabolic control. Two possible mechanisms have been implicated: repeated episodes of hyperglycemia and administration of high doses of insulin<sup>1,3,7,8</sup>.

Glucose enters the hepatocyte via passive diffusion, independent of insulin<sup>1-5,8</sup>. Once in the cell, it is converted into glucose-6-phosphate by glucokinase and is thereby trapped in the hepatocyte, increasing its intracellular concentration<sup>4,5,9</sup>. Subsequently, it is transformed into glycogen via glycogenesis<sup>2,9</sup>. Glycogen synthase, the rate-limiting enzyme in this process, is enhanced by excessive amount of insulin administered to cope with hyperglycemia, and also by high cytoplasmic glucose<sup>4,5,7</sup>. On the other hand, in case of insufficient insulin, as occurs in diabetic ketoacidosis, lipolysis is promoted,

which accounts for hyperlipidemia<sup>1</sup>. Ketone bodies stimulate synthesis of cortisol, which further enhances hyperglycemia and lipolysis<sup>1</sup>. The balance between glycogenesis and glycogenolysis, essential for determining a normal level of hepatic glycogen, is disturbed by frequent hypoglycemia and hyperglycemia often seen in poorly controlled diabetic patients<sup>2,9</sup>.

Glycogen hepatopathy may manifest clinically by abdominal pain, early satiety, hepatomegaly and occasionally splenomegaly<sup>1,3</sup>. The short stature, delayed sexual development and cushingoid appearance which characterize Mauriac syndrome, not present in our patient, arise in response to elevated cortisol already described<sup>1,4,5,9</sup>. The intracellular accumulation of glycogen causes cell lesion and consequent rise of transaminase levels of variable range (50 – 1600 U/L)<sup>1,9</sup>. It is not usually accompanied by abnormalities in other liver function tests, such as albumin or prothrombin time<sup>1,5</sup>. All these changes are reversible after optimization of metabolic control, in a period varying from 2 to 14 weeks<sup>2,4,5,9</sup>. Although this was never achieved in our patient, we verified correlation between periods of improved control and reduction in liver size and levels of liver enzymes. Therefore, in face of the risk of hepatic glycogenesis and NAFLD, screening for liver enzymes, particularly transaminases, is recommended in a patient with type 1 DM with hepatomegaly, dyslipidemia or poor metabolic control.

The investigation of hepatomegaly and raised transaminases presenting in a type 1 diabetic child or adolescent should rule out diseases such as viral hepatitis, autoimmune or toxic hepatitis, hemochromatosis, Wilson's disease and other metabolic or infiltrative hepatic diseases<sup>4</sup>. Clinical data are usually enough for excluding primary glycogen storage disease<sup>5,7</sup>.

The performance of liver biopsy remains a matter of controversy in the literature. Some authors defend its absolute need for

distinction between hepatic glycogenesis and NAFLD, which is impossible on clinical grounds, and for information on prognosis<sup>3</sup>. Others prefer delaying this invasive procedure until diagnosis of secondary glycogenesis is supported by reversal of the clinical and laboratory findings upon attainment of a correct metabolic control<sup>1,2,4,7</sup>. Considering the lack of consensus about this issue and the fact that our patient never achieved a lasting euglycemic period, we decided to perform liver biopsy, which allowed definitive diagnosis by demonstrating accumulation of glycogen in cytoplasm and nuclei of hepatocytes. Characteristically, fibrosis and necrosis are absent or insignificant<sup>1,5,9</sup>. Concomitant steatosis has been reported in the literature in 10 to 50% cases<sup>1,7,9</sup>. In this case, given the presence of hyperlipidemia, coexistence of steatosis was not surprising, which might worsen prognosis.

In summary, this case report contributes to emphasizing the importance of secondary hepatic glycogenesis as a possible under recognized entity in children and adolescents with poorly controlled type 1 diabetes who present with hepatomegaly and raised transaminases. Unlike NAFLD and other hepatopathies, it has a good prognosis and is reversible after optimization of metabolic control.

## REFERENCES

1. Bastardas MF, Barba MM, Cumeras AR, León MC, Canadell MG, Fernández DY, *et al.* Hepatomegalia por depósito de glucógeno hepático y diabetes mellitus tipo 1. *An Pediatr (Barc)* 2007; 67: 157-60.
2. Abaci A, Bekem O, Unuvar T, Ozer E, Bober E, Arslan N, *et al.* Hepatic glycogenosis: a rare cause of hepatomegaly in type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2008; 22: 325-8.
3. Rubio-Rivas M, Montero-Alfía P, Ordi-Ros J, Labrador M. Glucogenosis hepática y diabetes [letter]. *Med Clin (Barc)* 2005; 125: 279.
4. Munns CF, McCrossin RB, Thomsett MJ, Batch J. Hepatic glycogenosis: reversible hepatomegaly in type 1 diabetes. *J Paediatr Child Health* 2000; 36: 449-52.
5. Chatila R, West AB. Hepatomegaly and abnormal liver tests due to glycogenosis in adults with diabetes. *Medicine (Baltimore)* 1996; 75: 327-33.
6. Hudacko RM, Manoukian AV, Schneider SH, Fyfe B. Clinical resolution of glycogenic hepatopathy following improved glycemic control. *J Diabetes Complications* 2008; 22: 329-30.
7. Cuthbertson DJ, Brennan G, Walsh S, Henry E. Hepatic glycogenosis: abnormal liver function tests in type 1 diabetes [letter]. *Diabet Med* 2007; 24: 322-3.
8. Martocchia A, Risicato MG, Mattioli C, Antonelli M, Ruco L, Falaschi P. Association of diffuse liver glycogenosis and mild focal macrovesicular steatosis in a patient with poorly controlled type 1 diabetes [letter]. *Intern Emerg Med* 2008; 3: 273-4.
9. Torbenson M, Chen YY, Brunt E, Cummings OW, Gottfried M, Jakate S, *et al.* Glycogenic hepatopathy: an underrecognized hepatic complication of diabetes mellitus. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 508-13.

# Oligomenorreia na Adolescência

## – Avaliação na Prática Clínica

### *Oligomenorrhoea in Adolescence*

## – Evaluation in Clinical Practice

Pedro Rodrigues<sup>1,2</sup>, José Luís Castedo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo do Centro Hospitalar de São João, EPE

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

**Correspondência:** Pedro Rodrigues › Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo do Centro Hospitalar de São João, EPE › Alameda Prof. Hêrmani Monteiro › 4200-310 PORTO › pmm\_rodrigues@hotmail.com

#### RESUMO

Os ciclos menstruais das adolescentes apresentam frequentemente duração variável. O termo oligomenorreia é utilizado quando o intervalo entre dois ciclos menstruais é superior a 45 dias. Embora as causas de oligomenorreia na adolescência sejam variadas, na maioria dos casos não existe um distúrbio patológico subjacente. A avaliação clínica compreende a colheita da anamnese, a realização do exame físico e, quando necessário, a solicitação dos exames laboratoriais e imagiológicos mais adequados. Na orientação diagnóstica destas doentes deve considerar-se sempre a possibilidade de gravidez, seja intra-uterina ou ectópica. Nas adolescentes com oligomenorreia não grávidas, a abordagem clínica deve ser feita com base na existência ou não de pistas diagnósticas na avaliação feita inicialmente. Quando existe uma patologia identificável, o tratamento é dirigido primariamente à correcção do distúrbio subjacente.

#### PALAVRAS-CHAVE

Oligomenorreia; Adolescência; Ciclo menstrual; Gravidez.

#### ABSTRACT

*Adolescent menstrual cycles are often variable in length. The term oligomenorrhoea is used to describe intervals between menses greater than 45 days. Although causes of oligomenorrhoea in adolescence are variable, most cases don't have any underlying pathologic condition. Clinical evaluation comprises a careful history and physical examination and, when necessary, subsequent laboratory and radiographic exams. Diagnostic approach for these patients should begin by excluding the possibility of pregnancy, either intra-uterine or ectopic. On clinical evaluation of non-pregnant oligomenorrhoeic adolescents one should consider if they have findings that strongly suggest a particular diagnosis. In the presence of a pathological disturbance, treatment is primarily directed to its resolution.*

#### KEY-WORDS

*Oligomenorrhoea; Adolescence; Menstrual cycle; Pregnancy.*

## INTRODUÇÃO

O ciclo menstrual resulta de um complexo sistema de *feedback* entre hipotálamo, hipófise, ovários e útero e depende de alterações fisiológicas, psicológicas e patológicas que ocorrem ao longo da vida reprodutiva da mulher<sup>1</sup>.

A menarca ocorre habitualmente entre os 12 a 13 anos de idade<sup>2</sup>. As adolescentes apresentam frequentemente ciclos menstruais de duração variável, com tendência a ficarem mais regulares à medida que aumenta a idade ginecológica. A maioria dos ciclos menstruais durante a adolescência tem duração de 20 a 45 dias, mesmo ao longo do 1º ano ginecológico. O limite inferior do normal é de aproximadamente 20 dias, mas o limite superior do normal é mais variável, oscilando entre 40 e 45 dias. Assim, a duração dos ciclos menstruais nas adolescentes apresenta uma variabilidade fisiológica mais ampla do que sucede normalmente nas mulheres adultas, que é de 24 a 35 dias<sup>3</sup>.

Em 80 a 90% das adolescentes a duração do período menstrual é de 2 a 7 dias<sup>1</sup>. O fluxo menstrual médio por ciclo é de 30 ml, sendo o limite superior do normal de 80 ml<sup>3</sup>.

## HEMORRAGIA UTERINA ANORMAL

### DEFINIÇÃO

O termo hemorragia uterina anormal refere-se a hemorragia uterina que compreende parâmetros não habituais no ciclo menstrual<sup>4</sup>, nomeadamente:

- duração do período menstrual superior a 7 dias;
- fluxo menstrual por ciclo superior a 80 ml ou impressão subjectiva de maior quantidade em relação ao normal;
- interlúnios inferiores a 20 dias ou superiores a 45 dias;
- hemorragia vaginal entre dois períodos

- dos menstruais;
- coitorragia.

### TERMINOLOGIA

Ao longo dos anos têm surgido várias designações para descrever os padrões de hemorragia uterina anormal. As principais categorias de hemorragia uterina anormal na adolescência são<sup>5</sup>:

- amenorreia (ausência de ciclos menstruais transitória, intermitente ou permanente);  
A amenorreia é classificada em primária ou secundária. A amenorreia primária refere-se à ausência de menarca até aos 16 anos de idade. A amenorreia secundária refere-se à ausência de três ou mais ciclos menstruais consecutivos numa mulher com função menstrual prévia normal.
- oligomenorreia (intervalo entre os ciclos menstruais superior a 45 dias);
- polimenorreia (intervalo entre os ciclos menstruais inferior a 20 dias);
- hipermenorreia (ciclos regulares mas com fluxo excessivo e/ou de maior duração);
- hipomenorreia (ciclos regulares mas com fluxo diminuído e/ou de menor duração).

### ETIOLOGIA

Existem vários distúrbios que podem causar oligomenorreia na adolescência. As principais causas estão apresentadas no Quadro I.

QUADRO I: Causas de oligomenorreia de acordo com a fisiopatologia do distúrbio

#### Distúrbios do eixo hipotálamo-hipofisário

Distúrbios do peso e/ou consumo energético

- Anorexia nervosa
- Bulimia nervosa
- Exercício físico intenso
- Doenças crónicas

Imaturidade do eixo

Tumores do sistema nervoso central

Pseudociese

QUADRO I: Causas de oligomenorreia de acordo com a fisiopatologia do distúrbio (Continuação)

<b>Distúrbios do ovário</b>
Insuficiência ovárica prematura
Disgenesia das gónadas
Doenças auto-imunes
Fármacos anti-neoplásicos
Radioterapia pélvica
Tumores hormono-secretores
<b>Hiperprolactinemia</b>
Lactação
Fármacos
Adenoma da hipófise
Hipotiroidismo
<b>Hiperandrogenismo</b>
Síndrome do ovário poliquístico
Doença da supra-renal
<b>Outras</b>
Gravidez
Contraceção hormonal

## AVALIAÇÃO

A avaliação da adolescente com oligomenorreia inicia-se pela colheita da história clínica e pela realização do exame físico. A informação obtida deve orientar o eventual pedido de exames laboratoriais e imagiológicos complementares.

### HISTÓRIA CLÍNICA

A colheita da história clínica deve ser obtida com e sem a presença dos progenitores da adolescente. A presença dos pais, na maioria dos casos da mãe, pode permitir que a informação sobre o padrão do ciclo menstrual seja mais precisa. No entanto, algumas adolescentes preferem ser avaliadas sozinhas, particularmente se já tiverem sido sexualmente activas.

A idade da menarca deve ser obtida com a maior exactidão possível. Da mesma forma, é importante recolher informação detalhada sobre as características do ciclo menstrual, nomeadamente a frequência, duração e regularidade dos ciclos, bem como a ocorrência de episódios hemorrágicos anormais.

A quantidade de fluxo menstrual por ciclo é habitualmente uma medida pouco exacta, embora seja importante tentar

determiná-la em adolescentes que referem ter fluxo menstrual excessivo. O fluxo típico requer a utilização de 3 a 5 pensos higiénicos ou tampões por dia<sup>3</sup>.

Dados relativamente ao desenvolvimento pubertário da adolescente, como a idade da telarca e da pubarca, também podem auxiliar no diagnóstico diferencial.

A história sexual deve ser idealmente obtida sem a presença dos progenitores e deve incluir informação respeitante ao uso de preservativo e contraceção oral, número de parceiros sexuais, história prévia ou sintomas actuais de doenças sexualmente transmissíveis, história de gravidez ou abortamento, bem como história de abuso sexual<sup>6</sup>.

Na colheita da história clínica, é importante excluir a presença de doenças sistémicas crónicas e a utilização recente ou actual de contraceptivos hormonais, fármacos anti-neoplásicos e medicamentos associados a hiperprolactinemia.

Na revisão por aparelhos e sistemas deve investigar-se a existência de factores de stress, alterações do peso, mudança de hábitos alimentares e grau de actividade física habitual, bem como avaliar a presença de hirsutismo, acne, galactorreia, alterações visuais, cefaleias, náuseas, vómitos e dor abdominal<sup>6</sup>.

Os antecedentes familiares em relação a doenças ginecológicas, infertilidade, distúrbios da coagulação, doenças da tiróide e diabetes *mellitus* devem também constar da anamnese<sup>7</sup>.

### EXAME FÍSICO

A avaliação feita no exame físico pode ajudar a determinar a etiologia da oligomenorreia.

No exame físico geral é importante a avaliação dos sinais vitais (incluindo em ortostatismo), a determinação do peso, da estatura e da envergadura, a avaliação da curva de crescimento, do biótipo e da distribuição da massa gorda, a palpação da tiróide, o exame da pele (hirsutismo, acne, estrias, acantose nigricante, alopecia andro-



génica), do fundo ocular e dos campos visuais, o estadiamento de Tanner de desenvolvimento pubertário, a pesquisa de galactorreia, bem como a palpação abdominal de eventuais massas uterinas ou ováricas<sup>6,7</sup>.

O exame dos genitais externos está recomendado em todas as adolescentes e deve incluir avaliação da dimensão do clítoris, do desenvolvimento dos pêlos púbicos e da anatomia do hímen.

O exame pélvico é necessário para a avaliação das estruturas Müllarianas, nomeadamente o fundo da vagina e a presença de colo do útero, útero e ovários. Em adolescentes sexualmente activas deve incluir o exame bimanual e o exame com o espéculo. Em adolescentes virgens, cujo exame bimanual ou com o espéculo apropriado seja desconfortável, o exame recto-abdominal pode ser útil<sup>8</sup>.

#### EXAMES LABORATORIAIS

Todas as adolescentes com oligomenorreia devem realizar um teste de gravidez. A realização do teste através de *kits* comerciais acarreta a possibilidade de falsos negativos<sup>9</sup>, pelo que, se for negativo, não exclui logo a hipótese de gravidez. Os testes realizados em ambiente hospitalar apresentam maior sensibilidade, permitindo detectar uma gravidez cerca de 10 dias após a concepção.

A realização de doseamentos hormonais deve ser efectuada de acordo com os dados obtidos na anamnese e no exame objectivo. Nas adolescentes cuja informação clínica forneça escassa orientação diagnóstica deve avaliar-se sempre a possibilidade de hiperprolactinemia e de doenças da tiróide, supra-renais e ovários<sup>10</sup>.

#### EXAMES IMAGIOLÓGICOS

A realização de ecografia pélvica está indicada em adolescentes com exame físico suspeito ou limitado (nas quais vagina ou útero não foram identificados de forma

segura), em todas as adolescentes grávidas com dor abdominal ou pélvica, para avaliação de alterações estruturais da vagina e do colo do útero, para confirmação ecográfica de gestação intra-uterina e para avaliação dos anexos (massas ováricas, presença de múltiplos folículos à periferia).

Exames imagiológicos, como Tomografia Axial Computorizada (TAC) ou Ressonância Magnética (RM), da região abdomino-pélvica estão indicados em adolescentes com massas abdominais ou pélvicas ou com sinais de virilização rapidamente progressiva para identificar eventuais tumores das supra-renais ou dos ovários<sup>10</sup>.

### ABORDAGEM DIAGNÓSTICA

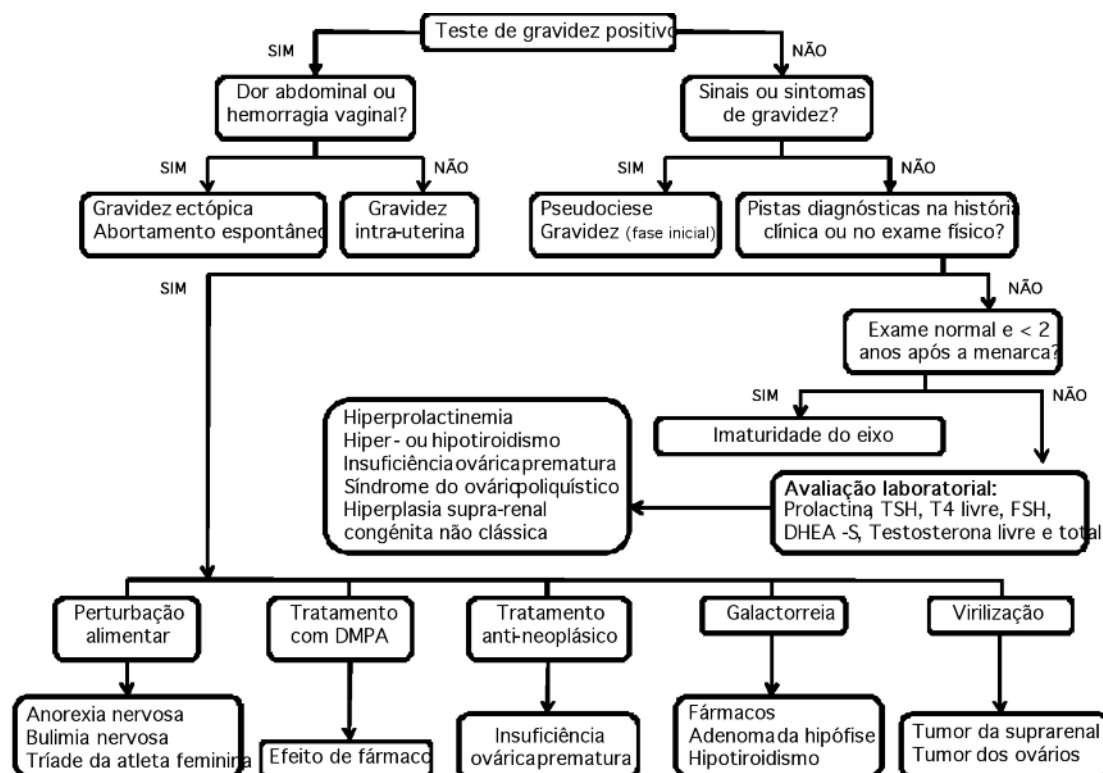
A Figura 1 representa um algoritmo proposto na abordagem diagnóstica de adolescentes com oligomenorreia<sup>10</sup>.

#### ADOLESCENTES GRÁVIDAS

A primeira questão a colocar é “A adolescente está grávida?”. A existência de uma gravidez é a causa mais comum de oligomenorreia na adolescência, pelo que a resposta a esta questão deve fazer parte da avaliação inicial de todas as adolescentes, independentemente da história sexual. Os testes de gravidez habituais baseiam-se no doseamento da  $\beta$ -HCG na urina. No entanto, o doseamento da  $\beta$ -HCG no soro tem maior sensibilidade. A confirmação de gravidez intra-uterina deve ser feita posteriormente por ecografia endovaginal. A prestação atempada e regular de cuidados pré-natais associa-se a menor morbidade e mortalidade nas grávidas adolescentes e nos seus descendentes<sup>10</sup>.

A possibilidade de gravidez ectópica ou abortamento espontâneo deve estar sempre presente em todas as adolescentes com oligomenorreia e queixas de dor abdominal ou hemorragia uterina anormal. A gravidez ectópica corresponde a cerca de 2% de todas as gestações, sendo mais frequente em

FIGURA 1: Abordagem diagnóstica de oligomenorreia em adolescentes



Adaptado de Paradise J. Evaluation of oligomenorrhea in adolescence. 2009 Jan. Disponível em <http://www.uptodate.com>

mulheres adultas do que em adolescentes.

O termo pseudociese é utilizado para descrever mulheres que acreditam estar grávidas e que manifestam sintomas e sinais de uma presumível gravidez, como náuseas, vômitos, hiperpigmentação das aréolas mamárias, galactorreia e distensão abdominal. É uma causa rara de oligomenorreia ou amenorreia. O diagnóstico é feito quando a doente insiste que está grávida, apesar do teste de gravidez ser negativo e de não haver aumento uterino nem partes fetais ou batimentos cardíacos fetais demonstráveis ecograficamente. Estas doentes devem ser avaliadas e orientadas por profissionais de saúde mental.

#### ADOLESCENTES NÃO GRÁVIDAS MAS COM PISTAS DIAGNÓSTICAS NA AVALIAÇÃO CLÍNICA

Excluída a hipótese de gravidez, algumas adolescentes oligomenorreicas apresentam sinais ou sintomas que sugerem fortemente um diagnóstico.

A anorexia e a bulimia nervosa são distúrbios do comportamento alimentar em que as alterações do ciclo menstrual surgem por disfunção hipotalâmica<sup>11</sup>. Na anorexia nervosa há uma perda de peso marcada (superior a 25% do peso corporal), associada a distorção da imagem corporal com medo extremo de engordar. A bulimia nervosa caracteriza-se por episódios de compulsão alimentar seguidos de períodos de restrição alimentar, auto-indução do vômito ou uso excessivo de laxantes ou diuréticos. Em 90 a 95% dos casos, estas perturbações do comportamento alimentar ocorrem em indivíduos do sexo feminino. O pico de incidência da anorexia nervosa situa-se entre os 13 e os 17 anos de idade, enquanto o da bulimia nervosa ocorre entre os 17 e os 25 anos. A secreção de gonadotrofinas em mulheres anorécticas apresenta um padrão pré-pubertário e pode haver anovulação persistente em mais de 50% das doentes, mesmo após retomarem peso normal. A taxa de mortalidade da anorexia nervosa é

de cerca de 9%. Na maioria dos casos o tratamento é difícil. As abordagens psiquiátricas mais aceites incluem psicoterapia individual, terapia de grupo e modificação comportamental. A terapêutica hormonal com contraceptivo oral está recomendada até que seja conseguida função ovulatória.

A tríade da atleta feminina é definida pela presença de distúrbio de comportamento alimentar, oligomenorreia ou amenorreia e osteoporose ou osteopenia<sup>12</sup>. Associa-se à prática de exercício físico vigoroso e a gravidade da doença depende da intensidade, duração e tipo de desporto praticado. Esta síndrome é mais frequente em desportos que privilegiam índices de massa corporal baixos, como ginástica, *ballet*, natação competitiva e corrida de média e longa distância. Os níveis de gonadotrofinas destas atletas habitualmente são inferiores aos valores normais dos primeiros dias da fase folicular do ciclo menstrual. A diminuição do grau de exercício habitual pode ser suficiente para restaurar a função ovulatória. Se os resultados não forem satisfatórios, recomenda-se o uso de um contraceptivo oral em dose baixa<sup>11</sup>.

Questões relacionadas com contracepção hormonal devem fazer parte da colheita da anamnese. A pílula contraceptiva oral combinada causa frequentemente oligomenorreia. A formulação injectável DMPA (acetato de medroxiprogesterona) é causa comum de oligomenorreia. Após um ano de contracepção, cerca de 50% das mulheres ficam amenorreicas e a maioria das restantes menstrua apenas uma vez em cada 3 meses<sup>13</sup>. Há uma forte correlação positiva entre a duração do tratamento com DMPA e a prevalência de amenorreia<sup>14</sup>.

A insuficiência ovárica prematura é um estado de hipogonadismo hipergonadotrófico que se caracteriza por depleção dos folículos ováricos antes dos 40 anos de idade<sup>11</sup>. Estas doentes apresentam desenvolvimento pubertário normal e um período variável de ciclos menstruais regulares, ao qual se segue o aparecimento de oligomenorreia ou amenorreia. A presença de níveis de FSH superiores a 40

UI/L em pelo menos duas determinações distintas confirma o diagnóstico. Pode ser causada por anomalias genéticas (45,X; 47,XXY; mosaicismo), doenças auto-imunes, quimioterapia ou radioterapia espinal ou pélvica. No entanto, na maioria dos casos não é possível identificar uma causa específica. Sempre que possível, o tratamento deve ser dirigido à etiologia subjacente. A terapêutica hormonal deve ser combinada. O componente estrogénico promove e mantém os caracteres sexuais secundários e previne o aparecimento prematuro de osteoporose. O componente progestativo previne o aparecimento de hiperplasia e carcinoma do endométrio.

O doseamento de prolactina sérica está recomendado nos casos de galactorreia espontânea ou à expressão, em adolescentes com história de ingestão medicamentosa associada a hiperprolactinemia e em adolescentes com oligomenorreia e escassa orientação diagnóstica na informação clínica<sup>10</sup>. Devem ser obtidos dois doseamentos diferentes. Alguns factores como stress, sono, actividade ou estimulação sexual e refeições podem causar aumento dos valores de prolactina. Considera-se como limite superior do normal o valor de 15 a 20 ng/ml. Medicamentos associados a hiperprolactinemia associam-se geralmente a níveis de prolactina entre 20 a 200 ng/ml. No Quadro II apresentam-se algumas classes de fármacos que podem causar hiperprolactinemia e oligomenorreia. Valores superiores a 200 ng/ml têm geralmente como causa subjacente um prolactinoma ou compressão da haste hipofisária. No processo de avaliação diagnóstica, também se deve considerar a possibilidade de hipotiroidismo uma vez que, embora raramente, a TSH pode promover a secreção de prolactina e causar galactorreia e/ou oligomenorreia. O tratamento da hiperprolactinemia consiste na correcção da causa subjacente. O recurso a agonistas da dopamina corrige a hiperprolactinemia e restabelece a regularidade menstrual na maioria dos casos.

QUADRO II: Classes de fármacos que podem causar hiperprolactinemia

**Anti-psicóticos atípicos**

Fenotiazinas (clorpromazina, clomipramina)

Haloperidol

**Anti-psicóticos típicos**

Risperidona

Olanzapina

**Anti-depressivos**

Clomipramina

Desipramina

**Fármacos gastrointestinais**

Cimetidina

Metoclopramida

**Anti-hipertensivos**

Metildopa

Reserpina

Verapamil

**Opiáceos**

Codeína

Morfina

A virilização representa uma forma grave de excesso de androgénios. Clinicamente, manifesta-se por alopecia androgénica, voz grave, diminuição do tamanho mamário, aumento da massa muscular, perda das linhas corporais femininas e clitoromegalia. O índice clitoriano, resultante do produto dos diâmetros sagital e transversal da base do clítoris, fornece a medida mais exacta de clitoromegalia<sup>11</sup> e é considerado anormal quando superior a 35 mm<sup>2</sup>. A presença de virilização rapidamente progressiva sugere a existência de tumores produtores de androgénios, que ocorrem mais frequentemente nos ovários do que nas supra-renais. Analiticamente, um valor de testosterona total 3 vezes superior ao limite superior do normal ou superior a 2 ng/ml é sugestivo de neoplasia. A androstenediona encontra-se em geral marcadamente aumentada em ambos os tipos de tumores. Níveis elevados de DHEA-S, superiores a 8 µg/ml, são sugestivos de tumor das supra-renais. Doentes com virilização de início recente apenas com discreta elevação dos androgénios devem ser também investigadas através de exames imagiológicos. A ecografia endovaginal é o método mais sensível para a detecção de tumores dos ovários. Para a detecção de tumores das supra-renais está indicada a realização de TAC ou RM abdominal. Se estes exames não

detectarem qualquer neoplasia, deve ser realizada cintigrafia dos ovários e das supra-renais com iodometilnorcolesterol antes de se prosseguir para exploração cirúrgica.

## ADOLESCENTES NÃO GRÁVIDAS E SEM PISTAS DIAGNÓSTICAS NA AVALIAÇÃO CLÍNICA

Adolescentes com oligomenorreia, sexualmente inactivas, sem sinais ou sintomas sugestivos de uma etiologia específica e com menarca há menos de 2 anos podem apresentar simplesmente imaturidade do eixo hipotálamo-hipófise-ovários<sup>10</sup>. Ciclos menstruais fora dos limites da normalidade são estatisticamente raros<sup>3</sup>. Estudos prospectivos mostraram que a incidência de patologia nesses casos é de 2 a 5%. Se persistirem mais de 2 anos após a menarca, requerem avaliação etiológica. A imaturidade do eixo hipotálamo-hipófise-ovários é a principal causa de oligomenorreia, em adolescentes não grávidas, nos primeiros 18 a 24 meses após a menarca<sup>15</sup>. No 1º ano ginecológico, 50% dos ciclos são anovulatórios, alguns dos ciclos de duração 'normal' são anovulatórios e alguns ciclos são ovulatórios com uma fase folicular longa. Geralmente, os ciclos tendem a tornar-se mais regulares à medida que aumenta a idade ginecológica<sup>1</sup>. No 3º ano ginecológico, 60 a 80% dos ciclos têm 21 a 34 dias de duração, sendo que a normalidade é alcançada por volta do 5º ao 6º ano ginecológico. O tempo necessário para que os ciclos menstruais se tornem ovulatórios está relacionado com a idade da menarca. Se a idade da menarca for antes dos 12 anos, entre os 12 e os 13 anos ou depois dos 13 anos, 50% dos ciclos serão ovulatórios em 1 ano, 3 anos ou 4 anos e meio, respectivamente<sup>16</sup>. Se a causa mais provável de oligomenorreia numa adolescente for imaturidade do eixo, está indicado o seu acompanhamento periódico.

Adolescentes com oligomenorreia sem pistas diagnósticas na avaliação clínica e com idade da menarca há mais de 2 anos

requerem avaliação laboratorial para exclusão de alterações como hiperprolactinemia, distúrbios da tiróide, insuficiência ovárica prematura, síndrome do ovário poliquístico e hiperplasia supra-renal congénita não clássica.

Adolescentes com disfunção tiroideia, quer hipotiroidismo quer hipertiroidismo, podem apresentar oligomenorreia. O diagnóstico faz-se pelo doseamento da TSH e da T4 livre. Posteriormente, deve ser feito o estudo etiológico do distúrbio subjacente e iniciar a estratégia terapêutica mais adequada.

A síndrome do ovário poliquístico (SOP) é responsável por mais de um terço dos casos de irregularidades menstruais na adolescência<sup>1</sup>. O espectro de manifestações clínicas é variável. Cerca de 66% das doentes apresentam irregularidades menstruais, com queixas de oligomenorreia ou amenorreia. Sinais de hiperandrogenismo, como hirsutismo, acne persistente, alopecia androgénica, seborreia e hiperhidrose, estão presentes em 48% dos casos. A prevalência de obesidade é de 38%, tipicamente de tipo andróide ou central. Algumas doentes apresentam acantose nigricante, que é um indicador de insulino-resistência. A detecção ecográfica de ovários poliquísticos na adolescência tem menor sensibilidade do que na idade adulta<sup>17</sup>. O ovário poliquístico pode não se desenvolver até dois ou mais anos após a menarca e é difícil de distinguir do ovário multi-quístico, uma variante normal na adolescência. Os critérios de diagnóstico da SOP foram revistos e são apresentados no Quadro III. São recomendações para avaliação da SOP os seguintes cenários clínicos<sup>18</sup>:

- adolescentes que apenas apresentam hirsutismo moderado ou grave, ou equivalentes a hirsutismo (como acne refractário a tratamento ou alopecia androgénica);
- adolescentes com hirsutismo leve ou obesidade juntamente com outra manifestação da síndrome (como irregularidades menstruais);
- adolescentes com irregularidades

menstruais que persistem há mais de 2 anos ou com hemorragia uterina disfuncional grave;

- adolescentes com obesidade intratável, independentemente da presença ou não de hirsutismo, equivalentes a hirsutismo ou irregularidades menstruais.

QUADRO III: Critérios de diagnóstico da síndrome do ovário poliquístico

*National Institute of Health, 1990*

Incluir **todos** os seguintes:

- Hiperandrogenismo e/ou hiperandrogenemia
- Oligo-ovulação
- Exclusão de distúrbios associados a excesso de androgénios e anovulação\*

*ESHRE / ASRM (Roterdão), 2003*

Incluir **2** dos seguintes, além de **excluir** distúrbios relacionados\*:

- Irregularidade menstrual devida a anovulação ou oligo-ovulação
- Evidência clínica e/ou bioquímica de hiperandrogenismo
- Ovários poliquísticos (por ecografia)

\*Hiperplasia supra-renal congénita não clássica, disfunção da tiróide, hiperprolactinemia, tumores produtores de androgénios, síndrome de Cushing, resistência aos glucocorticóides.

ESHRE = *European Society of Human Reproduction and Embryology*;

ASRM = *American Society of Reproductive Medicine*.

A abordagem diagnóstica recomendada para a SOP inclui doseamento dos androgénios, avaliação das causas de hiperandrogenismo e avaliação adicional após o diagnóstico da síndrome. A testosterona plasmática é o principal androgénio a dosear. O limite superior do normal de testosterona total em indivíduos do sexo feminino varia de 0,70 a 0,90 ng/ml. A maioria das doentes com SOP apresenta valores inferiores a 1,5 ng/ml. Níveis de testosterona total superiores a 2 ng/ml são raros e sugerem a presença de um tumor virilizante<sup>11</sup>. O doseamento da testosterona livre é uma medida mais sensível para detectar a presença de hiperandrogenismo, cerca de 50% mais sensível que a testosterona total. A DHEA-S é considerada um marcador de hiperandrogenismo de causa supra-renal mas pode estar aumentada (superior a 8 µg/ml) em cerca de 50% de mulheres anovulatórias com SOP<sup>18</sup>. Em relação ao doseamento das gonadotrofinas, a determinação da LH e da razão LH/FSH não são necessárias para o diagnóstico. Embora uma razão LH/FSH ele-

vada seja sugestiva de SOP, valores de LH baixos não excluem o diagnóstico<sup>11</sup>. Se houver evidência de hiperandrogenemia, é necessário excluir outras causas. O diagnóstico de SOP faz-se quando outros distúrbios hiperandrogénicos são excluídos. Para tal, recomenda-se a realização de exames ecográficos e de doseamentos hormonais. A ecografia permite rastrear a presença de tumores dos ovários e das supra-renais e patologia ovárica não relacionada com a SOP. A existência de alargamento ovárico, definido por volume superior a 10,8 ml<sup>3</sup> ou por área máxima superior a 5,5 cm<sup>2</sup>, é o achado ecográfico mais específico de ovário poliquístico na adolescência. A presença de múltiplos folículos (mais de 10 por plano máximo ou mais de 12 por ovário) é característica de ovários poliquísticos. No entanto, particularmente na adolescência, a distinção entre ovário poliquístico e multiquístico pode ser por vezes difícil. A ecografia dos ovários é feita preferencialmente por via endovaginal. A abordagem transabdominal, que é realizada em adolescentes virgens, pode subestimar a prevalência de ovários poliquísticos, embora tenha a vantagem de rastrear simultaneamente a presença de massas das supra-renais<sup>18</sup>. Em relação a outros doseamentos hormonais recomenda-se a determinação da prolactina, IGF-I, cortisol livre na urina de 24 horas, TSH, T4 livre e 17-hidroxiprogesterona. Um resultado alterado de qualquer um destes doseamentos sugere outra causa para o hiperandrogenismo, uma vez que serão normais em doentes com SOP. A SOP é um factor de risco de anomalia da tolerância à glicose, diabetes *mellitus* tipo 2 e síndrome metabólica. Por conseguinte, após se estabelecer o diagnóstico, é importante avaliar se estão presentes alterações da tolerância à glicose e outras componentes da síndrome metabólica. Todas as doentes com SOP devem realizar um perfil lipídico<sup>11</sup>. O rastreio de alterações da tolerância à glicose através da realização de PTGO (prova de tolerância à glicose oral) com 75 g de glicose está também

recomendado, particularmente se as doentes forem obesas. A PTGO deve ser feita mesmo com glicemias em jejum normais, uma vez que há um número substancial de mulheres com SOP que apresenta deterioração progressiva da tolerância à glicose<sup>18</sup>.

O tratamento da SOP é dirigido às manifestações clínicas da síndrome, nomeadamente as irregularidades menstruais, o hirsutismo e a obesidade. O tratamento da irregularidade menstrual é importante, porque adolescentes com anovulação crónica têm risco aumentado de hiperplasia e carcinoma do endométrio. A pílula contraceptiva oral combinada é a terapêutica de primeira linha. O componente progestativo inibe a proliferação endometrial, prevenindo o desenvolvimento de hiperplasia do endométrio e o risco associado de carcinoma. O componente estrogénico inibe a actividade do eixo hipotálamo-hipófise-ovários, reduzindo a produção ovárica de androgénios<sup>19</sup>. Deve optar-se por contraceptivos orais em que o componente progestativo tenha actividade anti-androgénica ou androgénica mínima. Se for eficaz, o tratamento deve ser mantido até que a adolescente seja ginecologicamente madura (cerca de 5 anos após a menarca) ou tenha perdido quantidade substancial de excesso de peso. Posteriormente, a pílula deve ser suspensa durante alguns meses para documentar a persistência ou não da síndrome. Como alternativa, o tratamento da irregularidade menstrual pode ser feito com o uso isolado e cíclico (7 a 10 dias de cada mês) de progesterona. A progesterona não se associa a risco de doença cardiovascular ou cancro da mama mas, por si só, não é um método contraceptivo. A eficácia da terapêutica com glucocorticóides na SOP é controversa. Se a produção supra-renal de androgénios for consideravelmente significativa, pode estar indicada a administração de um corticóide em dose baixa ao deitar. Os agonistas da GnRH são utilizados muito raramente em casos de intolerância ao contraceptivo oral e em que a progesterona é

insuficiente para regular os ciclos menstruais. Não estão recomendados em adolescentes com menos de 16 anos devido aos efeitos indesejáveis na densidade mineral óssea. O tratamento do hirsutismo pode incluir medidas cosméticas e dermatológicas e/ou terapêutica médica. Em adolescentes que não respondam de forma adequada às medidas cosméticas e dermatológicas, o agente farmacológico de escolha deve ser uma pílula contraceptiva oral combinada. Se for expectável uma melhoria substancial do hirsutismo, está recomendado o uso de fármacos anti-androgénicos mas sempre em associação à pílula<sup>20</sup>. A administração de corticóides no tratamento do hirsutismo parece não ter efeitos benéficos substanciais<sup>21</sup>. Em relação ao tratamento da obesidade, a perda de peso em adolescentes com SOP associa-se a melhoria da ovulação, da insulino-resistência e do excesso de androgénios<sup>22</sup>. A diminuição dos níveis de insulina pode ter efeitos benéficos nestas doentes. Os fármacos insulino-sensibilizadores também reduzem os níveis de androgénios, embora de forma modesta, e promovem a ovulação em cerca de 50% dos casos<sup>23</sup>. A metformina é o único fármaco insulino-sensibilizador habitualmente utilizado na adolescência. As tiazolidinedionas não estão recomendadas na adolescência em doentes com SOP não diabéticas<sup>24</sup>.

A hiperplasia supra-renal congénita não clássica é uma doença causada pela deficiência parcial da 21-hidroxilase, com padrão de hereditariedade autossómico recessivo. A forma de apresentação clínica é praticamente idêntica à da SOP, caracterizando-se habitualmente por irregularidades menstruais e hirsutismo progressivo de aparecimento tardio em doentes com órgãos genitais normais e sem alterações hidroelectrolíticas<sup>11</sup>. O rastreio é feito através do doseamento da 17-hidroxiprogesterona sérica, em amostra matinal, na fase folicular do ciclo ou em qualquer dia de ciclos anovulatórios. Valores inferiores a 2 ng/ml excluem o diagnóstico e valores superiores a

8 ng/ml confirmam o diagnóstico<sup>11</sup>. Valores intermédios, entre 2 e 8 ng/ml, são altamente sugestivos mas não estabelecem o diagnóstico. Nesses casos está indicada a realização do teste de ACTH rápido, em que um aumento da 17-hidroxiprogesterona acima dos 10 ng/ml, 60 minutos após, confirma o diagnóstico<sup>25</sup>.

## CONCLUSÕES

A oligomenorreia é uma das queixas do foro ginecológico mais frequentemente referida durante a adolescência. As causas mais prevalentes, além das variações fisiológicas dos primeiros ciclos menstruais após a menarca, incluem gravidez, SOP, fármacos e distúrbios do comportamento alimentar. A avaliação clínica inicial de uma adolescente com oligomenorreia deve determinar se ela está ou não grávida. Em algumas adolescentes não grávidas, a história clínica e o exame físico fornecem pistas sugestivas de determinados distúrbios. No entanto, a maioria irá necessitar de avaliação laboratorial para se estabelecer um diagnóstico definitivo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hickey M, Balen A. *Menstrual disorders in adolescence: investigation and management*. Human Reproduction Update 2003; 9: 493-504.
2. Herman-Giddens ME, Slora EJ, Wasserman RC, et al. *Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in office practice: a study from the Pediatric Research in Office Settings network*. Pediatrics 1997; 99: 505-512.
3. Hillard P. *Menstruation in Adolescents: What's normal, What's not*. Ann NY Academy Sciences 2008; 1135: 29-35.
4. Slap GB. *Menstrual disorders in adolescence*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2003; 17: 75.
5. Deligeoroglou E, Tsimaris P, Deliveliotou A, et al. *Menstrual disorders during adolescence*. Pediatr Endocrinol Rev 2006. 3 Suppl 1: 150.
6. Mitan LA, Slap GB. *Adolescent menstrual disorders*. Med Clin North Am 2000; 84: 851.
7. Rimsza, ME. *Dysfunctional uterine bleeding*. Pediatr Rev 2002; 23: 227.
8. Bravender T, Emans SJ. *Menstrual disorders. Dysfunctional uterine bleeding*. Pediatr Clin North Am 1999; 46: 545.
9. Cole LA, Khanlian SA, Sutton JM, et al. *Accuracy of home pregnancy tests at the time of missed menses*. Am J Obstet Gynecol 2004; 190: 100.
10. Paradise J. *Evaluation of oligomenorrhea in adolescence*. 2009 Jan. Disponível em <http://www.uptodate.com>
11. Bulun S, Adashi E. *The physiology and pathology of the female reproductive axis*. In: Williams Textbook of Endocrinology. 11<sup>th</sup> ed. Elsevier; 2007. 541-614.
12. Warren MP, Brooks-Gunn J, Fox RP, et al. *Osteopenia in exercise-associated amenorrhea using ballet dancers as a model: a longitudinal study*. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 3162.
13. Polaneczky M, Liblanc M. *Long-term depot medroxyprogesterone acetate use in inner-city adolescents*. J Adolesc Health 1998; 23: 81.
14. Mainwaring R, Hales HA, Stevenson K, et al. *Metabolic parameter, bleeding and weight changes in U.S. women using progestin only contraceptives*. Contraception 1995; 51: 149.
15. Lemarchand-Beraud T, Zufferey MM, Reymond M, et al. *Maturation of the hypothalamo-pituitary-ovarian axis in adolescent girls*. J Clin Endocrinol Metab 1982; 54: 241.
16. Apter D, Vihko R. *Early menarche, a risk factor for breast cancer, indicates early onset of ovulatory cycles*. J Clin Endocrinol Metab 1983; 57: 82.
17. Buggs C, Rosenfield RL. *Polycystic ovary syndrome in adolescence*. Endocrinol Metab Clin North Am 2005; 34: 677.
18. Rosenfield RL. *Clinical features and diagnosis of polycystic ovary syndrome in adolescents*. 2009 Jan. Disponível em <http://www.uptodate.com>
19. Rosenfield RL. *Treatment of polycystic ovary syndrome in adolescents*. 2009 Jan. Disponível em <http://www.uptodate.com>
20. Rosenfield RL. *Clinical Practice: Hirsutism*. N Engl J Med 2005; 353: 2578.
21. Martin KA, Chang RJ, Ehrmann DA, et al. *Evaluation and treatment of hirsutism in premenopausal women: an endocrine society clinical practice guideline*. J Clin Endocrinol Metab 2008; 93: 1105.
22. Ehrmann DA. *Medical progress: polycystic ovary syndrome*. N Engl J Med 2005; 352: 1223.
23. Bridger T, MacDonald S, Baltzer F, et al. *Randomized placebo-controlled trial of metformin for adolescents with polycystic ovary syndrome*. Arch Pediatr Adolesc Med 2006; 160: 241.
24. Baillargeon JP, Jakubowicz DJ, Luorno MJ, et al. *Effects of metformin and rosiglitazone, alone and in combination, in nonobese women with polycystic ovary syndrome and normal indices of insulin sensitivity*. Fertil Steril 2004; 82: 893.
25. Speiser P, Azziz R, Baskin L, et al. *Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency*. JCEM 2010; Vol. 95(9):4133-4160.



# Pubarca Precoce – Um Diagnóstico de Exclusão

## *Premature Pubarche – a diagnosis of exclusion*

Marta Alves<sup>1</sup>, Carla Costa<sup>2</sup>, Cíntia Correia<sup>2</sup>, Celestino Neves<sup>1</sup>, Davide Carvalho<sup>1</sup>, Manuel Fontoura<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Hospital de São João, EPE, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto

<sup>2</sup> Serviço de Pediatria, Hospital de São João, EPE, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto

Correspondência: Marta Alves > Serviço de Endocrinologia > Hospital de São João > Alameda Prof. Hernâni Monteiro > 4200-319 PORTO > marta.mfa@gmail.com

### RESUMO

A pubarca precoce é uma entidade clínica que se associa a alterações metabólicas e hormonais na adolescência e idade adulta, não devendo ser encarada como uma condição totalmente benigna. O seu reconhecimento precoce permite uma abordagem clínica que poderá minorar as consequências físicas e metabólicas. As suas manifestações clínicas podem sobrepor-se às manifestações de diferentes quadros clínicos, entre os quais se destaca, pela sua prevalência, a hiperplasia supra-renal congénita. A patologia neoplásica benigna ou maligna das gónadas e das supra-renais devem também ser excluídas. Nesta publicação pretendemos apresentar uma perspectiva global da pubarca precoce e dos diagnósticos clínicos que devem ser pensados e excluídos.

### PALAVRAS-CHAVE

Pubarca; Adrenarca; Precoce; Hiperandrogenismo.

### ABSTRACT

*Premature pubarche is a clinical entity that is associated with metabolic and hormonal changes in adolescence and adulthood, and so should not be viewed as a totally benign condition. Its early recognition allows a clinical approach that can alleviate physical and metabolic consequences. Its clinical manifestations may overlap with those of different clinical entities, among which stands out for its prevalence, congenital adrenal hyperplasia. Benign or malignant neoplastic pathology of adrenal and gonadal glands should also be excluded. In this publication we present an overview of premature pubarche and of the diagnosis that should be thought out and excluded.*

### KEYWORDS

*Pubarche; Adrenarche; Precocious; Hyperandrogenism.*

---

## INTRODUÇÃO

O desenvolvimento precoce de pilosidade púbica e/ou axilar sem outros sinais de

virilização ou de desenvolvimento pubertário foi inicialmente descrito por Wilkins, tendo sido chamado de *pubarca precoce* (PP)<sup>1</sup>. Anos mais tarde, outros investigado-

res sugeriram que as glândulas supra-renais poderiam estar envolvidas no desenvolvimento desta condição e denominaram-na de “adrenarca precoce”<sup>2</sup>. Na verdade, na maioria das vezes, a PP parece dever-se à antecipação da maturação normal da função da supra-renal (adrenarca precoce)<sup>3-5</sup>.

A PP é cerca de 10 vezes mais comum no sexo feminino. Define-se pelo aparecimento de pilosidade púbica e/ou axilar antes dos 6 a 8 anos, na rapariga, e dos 7 a 9 anos no rapaz, correspondendo aos estádios 2 e 3 de Tanner<sup>6</sup>. Segundo outro autor, o aparecimento da pilosidade púbica em meninas pode considerar-se normal quando ocorre depois dos 7 anos de idade na raça branca e após os 6 anos em afro-americanas<sup>7</sup>. O surgimento desta pilosidade pode reflectir vários processos, entre os quais se destacam a adrenarca precoce, a forma não clássica dos défices de 21-hidroxilase e de 3 $\beta$ HO-esteróide desidrogenase, a puberdade precoce e os tumores das supra-renais e gonadais<sup>6</sup>.

## FISIOPATOLOGIA

A causa da hipersecreção de androgénios adrenais na adrenarca precoce não está ainda totalmente esclarecida. Várias hipóteses foram levantadas, entre as quais constam a possibilidade de hipersecreção hipofisária de uma hormona que partilhe a sequência de aminoácidos 79-96 da pró-opiomelanocortina e que actue como a ACTH, estimulando excessivamente a produção de androgénios adrenais<sup>8,9</sup>; a aceleração da maturação da *zona reticularis*<sup>10</sup>; a fosforilação serina/treonina do citocromo P450c17 (CYP17) por uma proteína cinase dependente de AMP cíclico que poderá levar ao aumento acentuado da actividade da sua 17,20 liase, cuja activação prematura pode ser responsável pela estimulação precoce da secreção de androgénios<sup>11</sup>; a actuação directa da CRH (*hormona corticotrófica*) na libertação de androgénios também parece exercer

um papel importante na adrenarca normal e precoce<sup>12,13</sup>. O *status* nutricional pode também ser um regulador da adrenarca. O ganho de peso pré-natal e pós-natal parece desempenhar influências distintas na adrenarca. O mesmo se passa dentro do espectro de peso normal: recém-nascidos pequenos que rapidamente ganham peso durante a infância têm níveis de androgénios circulantes mais elevados<sup>14,15</sup>.

Os defeitos enzimáticos da esteroidogénese são causas patológicas de pubarca precoce, surgindo com prevalências distintas em diferentes populações e serão abordados mais à frente<sup>16-21</sup>.

## ADRENARCA PRECOCE

A adrenarca precoce, também conhecida como *pubarca precoce típica*, isolada ou prematura, refere-se à secreção precoce de androgénios adrenais, que resulta no desenvolvimento de pilosidade púbica (*pubarca*) antes dos 6-8 anos nas raparigas e dos 7-9 anos nos rapazes. Pode ainda incluir o aparecimento de pilosidade axilar e a secreção apócrina, processos que também são independentes do desenvolvimento pubertário<sup>6</sup>. É a causa mais frequente de PP, sendo responsável por 80 a 95% dos casos<sup>22-25</sup>.

A incidência de PP por adrenarca precoce é quase dez vezes maior em raparigas que em rapazes<sup>26</sup>. É também mais frequente nas crianças “grandes” ou com patologia neurológica<sup>6</sup>.

Na adrenarca precoce não existem outros sinais de puberdade precoce, nomeadamente a aceleração da velocidade de crescimento ou a maturação dos órgãos genitais externos. Não se observam, também, sinais de virilização exuberante. O aumento da pilosidade faz-se lentamente e os outros sinais de puberdade aparecem na idade habitual. O diagnóstico diferencial clínico entre a PP e as formas não clássicas de hiperplasia supra-renal congénita pode, no entanto, ser difícil<sup>6</sup>.

Tipicamente, o aparecimento de pêlo púbico geralmente escuro, ondulado e grosso está geralmente limitado aos lábios maiores nas meninas, mas pode espalhar-se por toda a área púbica<sup>5,27</sup>. Pode também encontrar-se pilosidade axilar, aumento do odor corporal, pele oleosa e acne. Na PP isolada o aumento do pénis ou do clítoris estão ausentes e o desenvolvimento dos testículos e glândulas mamárias é pré-pubertário.

As crianças com PP são geralmente mais altas que os seus pares, aquando do diagnóstico e frequentemente o crescimento acentuado tem início na infância precoce<sup>22,28,29</sup>. A velocidade de crescimento e a maturação óssea estão moderadamente aumentadas para a idade cronológica, mas estão de acordo com a idade para a altura<sup>22,28,29</sup>. Nas meninas, estas características clínicas são acompanhadas por níveis aumentados de IGF-1, que persistem durante todo o desenvolvimento pubertário e na adolescência<sup>30,31</sup>.

As crianças que se apresentam com PP devem ser adequadamente examinadas no que respeita ao desenvolvimento testicular ou mamário, à estatura, idade óssea e distribuição da pilosidade púbica. Crianças com pilosidade anormal, com evidência de desenvolvimento pubertário ou idade óssea avançada devem ser avaliadas com doseamentos hormonais, incluindo os níveis de testosterona (T) e sulfato de dihidroepiandrosterona (DHEA-S). Se os resultados não são consistentes com adrenarca precoce é necessária investigação adicional.

Na adrenarca precoce os níveis de DHEA, DHEA-S, androstenediona ( $\Delta 4$ -A) e T estão, com frequência, moderadamente elevados para a idade cronológica, mas encontram-se nos níveis esperados para o estadió de Tanner<sup>3,4,21</sup>. O aumento moderado de DHEA-S ( $>40\mu\text{g/dL}$ ) é o melhor marcador. Os níveis de T,  $\Delta 4$ -A e 17OH-progesterona (17-HOP) correspondem aos valores normais para o estadió P2 de Tanner<sup>3,4,21</sup>. A res-

posta à estimulação com ACTH reflecte estas alterações, predominando o aumento de 17-hidroxipregnenolona e de DHEA<sup>32</sup>. A LH, a FSH e o estradiol são pré-pubertários, o que permite o diagnóstico diferencial com puberdade precoce. Em alguns casos, os níveis de androgénios são os esperados para a idade cronológica o que pode traduzir um aumento da sensibilidade periférica aos androgénios<sup>27,33</sup>.

O diagnóstico de PP isolada só pode ser admitido após exclusão de puberdade precoce verdadeira e das formas não clássicas de hiperplasia adrenal congénita.

Algumas meninas exibem níveis basais e após estimulação com tetracosactídeo (ACTH sintético) superiores aos encontrados na fase pubertária inicial, o que se denomina de adrenarca exagerada<sup>34,35</sup>. Considera-se ser uma manifestação precoce da desregulação esteroideogénica da actividade da CYP17 adrenal e está associada a maior risco de desenvolvimento de hiperandrogenismo supra-renal persistente e de desenvolvimento de hiperandrogenismo ovárico<sup>35,36</sup>. De facto, as meninas com adrenarca exagerada e PP encontram-se em maior risco de desenvolverem hiperandrogenismo ovárico na adolescência<sup>35</sup>.

As crianças do sexo feminino com PP isolada geralmente apresentam idade de início da puberdade verdadeira mais baixa, na faixa normal, uma progressão pubertária normal e estatura adulta final normal<sup>22</sup>. No entanto, quando a PP é precedida por história de baixo peso ao nascer, a puberdade inicia-se mais cedo, a progressão da puberdade é mais rápida, a menarca ocorre mais cedo 8 a 10 meses e a altura final diminui, em média 6,5cm em comparação com aquelas com peso normal ao nascer<sup>37</sup>. A hiperinsulinemia parece desempenhar um papel estimulador crucial na aceleração do início e da progressão da puberdade, o que se verifica quer em meninas com história de baixo peso ao nascer, quer naquelas com PP<sup>30,37</sup>.

## HIPERPLASIA SUPRA-RENAL CONGÉNITA (HSRC) TARDIA

Em 5 a 20% dos casos, a causa de PP é a hiperplasia congénita da supra-renal de início tardio, que se deve principalmente ao défice parcial de 21-hidroxilase (em 95% dos casos) por mutação do gene CYP 21A2 (ou CYP21), o que leva à excessiva produção de androgénios<sup>38-41</sup>. Trata-se de uma condição rara, potencialmente grave<sup>25</sup>. Se não diagnosticada atempadamente, pode levar à aceleração da maturação óssea<sup>42</sup>, estatura final reduzida<sup>43</sup>, e na adolescência, a acne cística grave<sup>43,44</sup>, hirsutismo<sup>45</sup> e à redução da fertilidade<sup>25,46,47</sup>. São muito raros os casos em que se diagnostica um défice de 3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (codificada pelo gene HSD3B2) ou de 11-hidroxilase (CYP11B1)<sup>48</sup>.

O diagnóstico faz-se pela resposta hormonal exagerada após estimulação com ACTH sintético (Synacthen®)<sup>38,39,49</sup>, especificamente com a elevação da 17-HOP.

Vários estudos e *guidelines* apresentam diversas indicações para a realização da prova de estimulação com Synacthen® em crianças com PP<sup>25</sup>. Dado que não existem características clínicas que consigam prever, com certeza, o desenvolvimento da HSRCT, como a PP representa a sua primeira manifestação, e dadas as repercussões clínicas, muitos autores consideram que esta prova deva ser realizada em todas as crianças com PP, facilmente se excluindo este diagnóstico<sup>21,23,25,42,50-56</sup>. Esta abordagem sistemática assegura uma sensibilidade de diagnóstico de 100%, mas conduz a um resultado negativo em cerca de 80% dos casos. Outros autores defendem a aplicação do teste apenas em crianças com níveis basais elevados de 17-HOP<sup>21,23,25,52,53,55,57-59</sup>,  $\Delta 4A$ <sup>55,58</sup> ou do rácio de DHEA/ $\Delta 4A$  superior a 1<sup>25,53</sup>. Contudo, o valor preditivo negativo dos limites de referência nunca havia sido aferido em crianças com PP<sup>18,25,52,53,55,58-60</sup> até Armengaud e colaboradores<sup>25</sup> fazerem um

estudo cohort retrospectivo em que avaliaram todos os casos de PP (n=238) observados entre 1999 e 2006, todos com prova de estimulação com tetracosactídeo (Synacthen®). Trata-se do maior estudo publicado realizado em crianças com PP. Verificou-se que o limiar de 2ng/ml para a 17-HOP permitiu um valor preditivo negativo de 100%. Este valor de 2ng/ml é o mesmo proposto e validado por Azziz e colaboradores com base numa população de mulheres hiperandrogénicas<sup>59</sup>. Armengaud e colaboradores<sup>25</sup> verificaram ainda que um valor de  $\Delta 4A$  basal acima de 0,95ng/ml ou um valor basal de T acima de 0,15ng/ml se associaram forte e significativamente com o diagnóstico de HSRCT, embora com valor preditivo inferior<sup>25</sup>.

Os dados do estudo de Armengaud e colaboradores apoiam ainda a crença clínica de que o avanço na idade óssea é maior nestes doentes do que naqueles com adrenarca precoce<sup>25</sup>.

É, genericamente, aceite que a prova de estimulação com Synacthen® deve fazer-se quando os valores basais de 17-HOP ou T são elevados, se houver avanço da idade óssea, ou se existirem sinais de pubarca atípica (acne quística ou macrogenitosomia)<sup>6</sup>. Em adolescentes com ciclos menstruais, o doseamento de 17-HOP deve ser realizado na fase folicular, pois na fase luteínica parte da 17-HOP tem origem ovárica, podendo dar lugar a resultados falsamente positivos<sup>6</sup>.

A frequência do défice de 21-hidroxilase, o defeito enzimático mais frequente, em crianças com PP é extremamente variável, entre 0 e 40%, o que provavelmente se deve à variabilidade étnica nas diferentes populações estudadas. Mutações no gene da 3- $\beta$ -desidrogenase tipo II foram também identificados em doentes com PP e níveis extremamente elevados de 17-hidroxipregnenolona após estimulação com tetracosactídeo. O défice de 11- $\beta$ -hidroxilase pode também ser responsável pela HSRCT<sup>61</sup>. O teste de esti-

mulação com ACTH sintético afasta a hipótese de HSRCT, excepto o estado portador. Os níveis de gonadotropinas, quer os níveis basais, quer os níveis após estimulação com GnRH (*hormona gonadotrófica*) estão nos níveis prepubertários normais.

A identificação precoce da HSRCT torna possível o tratamento substitutivo que controla os sintomas e as consequências no desenvolvimento associadas ao hiperandrogenismo<sup>25</sup>.

Actualmente, não existe suficiente evidência que sugira que o tratamento profilático precoce com glucocorticóides em crianças com HSRC assintomática ou ligeiramente sintomática seja superior em relação à atitude expectante em termos de *outcomes* a longo-prazo no que respeita ao crescimento, fertilidade ou condições metabólicas relacionadas. Em crianças assintomáticas os potenciais efeitos adversos da corticoterapia provavelmente superam os benefícios, pelo que o tratamento não está indicado<sup>48,62,63</sup>. A corticoterapia em baixas doses deve ser reservada para crianças com início precoce e rápida progressão da pilosidade púbica e corporal, crescimento e/ou idade óssea. Similarmente em adultos, o tratamento hormonal deve ser reservado a mulheres que sofram de sintomas decorrentes do excesso de androgénios que não sejam resolvidos por outros métodos<sup>48</sup>.

## PATOLOGIA TUMORAL

### TUMORES DA SUPRA-RENAL

A produção de esteróides sexuais por formações tumorais em crianças pré-púberes é rara, mas constitui uma importante causa de puberdade precoce periférica. Os sintomas de apresentação dependem da localização, do tipo de tumor e se este produz estrogénios, androgénios ou ambos.

A pilosidade púbica e/ou axilar pode denunciar a existência de tumores supra-

renais (adenomas e carcinomas adrenocorticais) na infância. São tumores raros, constituindo menos de 0,6% dos tumores infantis e 0,3% dos tumores malignos nestas idades. A sua incidência é de 3-40/100000 crianças com menos de 15 anos. O diagnóstico ocorre, em média, pelos 4 anos; 41% surgem antes dos 2 anos e 71% antes dos 5 anos de idade<sup>25</sup>.

Contrariamente aos tumores supra-renais em adultos, a maioria produz hormonas esteróides. Geralmente induzem sinais marcados de virilização sistémica rapidamente progressiva (voz grave; aumento de volume do clítoris ou do pénis, apesar de testículos pequenos; aceleração da velocidade de crescimento; pilosidade púbica e axilar; hirsutismo explosivo; aumento das massas musculares)<sup>25</sup>, o que se deve ao aumento dos níveis circulantes de androgénios adrenais. Os níveis hormonais são muito variados e, nalguns casos, os doseamentos hormonais encontram-se no limite superior da normalidade para a idade. Os adenomas e carcinomas virilizantes segregam grandes quantidades de DHEA e DHEA-S e, ocasionalmente, T. Podem também observar-se níveis elevados  $\Delta 4$ -A.

Podem coexistir sinais de hipercortisolismo pela produção de glucocorticóides. Ao invés do que se passa na HSRC, no carcinoma da SR, os glucocorticóides não suprimem o aumento da secreção de androgénios adrenais<sup>64</sup>.

Raramente, o adenoma adrenal pode produzir T e aldosterona simultaneamente, manifestando-se também com hipertensão arterial e hipocalémia. Variações na actividade enzimática de biosíntese intratumoral podem, raramente, resultar no aumento dos estrogénios circulantes com subsequente feminização, manifestando-se, neste caso, como puberdade precoce periférica no sexo feminino e com ginecomastia no sexo masculino<sup>65</sup>.

A avaliação da idade óssea mostra uma idade avançada em relação à idade crono-

lógica. A tomografia computadorizada ou a ressonância magnética abdominal são importantes para localização do tumor<sup>65</sup>.

Estes tumores são mais frequentes no sexo feminino, em crianças com menos de 5 anos e associados a hemi-hipertrofia isolada, síndrome de Beckwith-Wiedemann, síndrome de neoplasias endócrinas múltiplas (MEN), malformações congénitas do tracto genitourinário, hamartomas e tumores cerebrais. Os níveis elevados de T podem causar alterações do comportamento como irritabilidade e hiperactividade<sup>66</sup>.

A maioria dos tumores adrenocorticais funcionantes são malignos e a sua remoção cirúrgica é o tratamento de escolha<sup>66</sup>.

### TUMORES OVÁRICOS

Os tumores ováricos constituem cerca de 1% de todos os tumores nas crianças com menos de 17 anos, podendo ser benignos ou malignos. As neoplasias primárias do ovário em crianças podem originar-se dos cordões sexuais ou do tecido estromal, do epitélio, ou da linha de células germinativas<sup>67</sup>, sendo os tumores de células da granulosa os tumores ováricos que mais frequentemente causam puberdade precoce<sup>68</sup>. Em contraste, em adultos, os tumores com origem epitelial são os mais frequentes<sup>69</sup>.

Estes tumores surgem em crianças pré-púberes, em média, pelos 10 anos, mas já foram descritos em lactentes<sup>70,71</sup>. A maioria dos tumores ováricos produzem estrogénios, o que resulta em feminização, embora a produção de androgénios também possa ocorrer, causando hirsutismo e outros sinais de virilização<sup>67,72</sup>. Frequentemente, surgem sintomas abdominais, como dor, distensão e ascite e poderá palpar-se massa abdominal. O tratamento primário é cirúrgico, podendo ser necessária a quimioterapia adjuvante<sup>73</sup>. O prognóstico geralmente é bom, particularmente naqueles com tumor juvenil de células da granulosa<sup>70</sup>.

### TUMORES TESTICULARES

Os tumores das células de Leydig, que constituem aproximadamente 3% de todos os tumores testiculares<sup>74</sup>, são os tumores do estroma gonadal mais frequentemente associados com puberdade precoce<sup>75</sup>. Embora 10% desses tumores sejam malignos no adulto, geralmente são benignos nas crianças. Caracterizam-se, tipicamente, pela coexistência de níveis elevados de T e sinais de virilização.

Em vários casos, mutações somáticas activadoras do receptor da LH mostraram ser responsáveis pelo surgimento de tumores de células de Leydig associados a puberdade precoce<sup>76,77,78</sup>.

Os tumores dos cordões sexuais (células de Sertoli) raramente foram descritos. Nestes, a ginecomastia e os sinais de virilização são característicos<sup>76</sup>.

A elevação da ACTH em rapazes com HSRC não tratada ou subtratada pode provocar o crescimento de massas testiculares correspondentes a tecido supra-renal heterotópico, mimetizando tumores testiculares de células intersticiais<sup>79</sup>.

### TUMORES DAS CÉLULAS GERMINATIVAS

Estão descritas diferentes localizações de tumores das células germinativas não gonadais, incluindo o fígado<sup>80</sup>, os pulmões<sup>81</sup>, o mediastino<sup>82</sup>, a glândula pineal<sup>83</sup>, os gânglios basais, o tálamo e o hipotálamo<sup>84</sup>. Marcadores tumorais úteis no diagnóstico e seguimento destes tumores incluem a  $\alpha$ -fetoproteína, a gonadotrofina coriónica  $\beta$  humana ( $\beta$ -HCG) e a glicoproteína  $\beta$ 1 específica da gravidez<sup>85</sup>. Porque a puberdade precoce neste contexto ocorre como resultado da secreção ectópica de  $\beta$ -HCG, que mimetiza a acção da LH nas células de Leydig testiculares, a esmagadora maioria dos casos são descritos em rapazes. O aumento da actividade da aromatase tumo-

ral em contexto de produção simultânea de  $\beta$ -HCG tem sido sugerida para justificar casos raros de femininização precoce em crianças do sexo feminino com tumores de células germinativas<sup>86,87</sup>.

## SEGUIMENTO E REPERCUSSÕES METABÓLICAS DA PUBARCA PRECOCE

Evidência crescente tem sustentado a noção de que a PP em meninas possa ser um precursor de síndrome metabólico e possa preceder o desenvolvimento de hiperandrogenismo ovárico clínico na adolescência, não devendo continuar a ser encarada como uma condição benigna<sup>32,49,88,89</sup>. Esta sequência parece ocorrer mais frequentemente quando a PP é precedida por redução do crescimento fetal, seguido de uma recuperação pós-natal excessiva em estatura e particularmente em peso<sup>89</sup>. É sobre este assunto que nos debruçamos de seguida.

Em raparigas com PP e história de baixo peso ao nascer, a puberdade tende a iniciar-se mais cedo e a progredir mais rapidamente, de modo que a altura final pode ser moderadamente reduzida. Nestas raparigas, particularmente nas mais hiperinsulinémicas, o tratamento com metformina pode reverter a progressão da PP para hiperandrogenismo ovárico clínico, pode normalizar a composição corporal e o excesso de gordura visceral e pode atrasar a progressão da puberdade, sem a atenuação do crescimento linear e da mineralização óssea, sugerindo que a altura adulta possa ser otimizada<sup>88</sup>.

Uma vez excluídas as causas de puberdade precoce e a hiperplasia SR não clássica não é necessário qualquer tratamento, mas é necessária a vigilância a longo-prazo. De facto, 40% das raparigas pós-pubertárias com diagnóstico prévio de PP têm uma incidência aumentada de hiperandrogenismo ovárico funcional<sup>35</sup>. A hiperinsulinemia é comum em adolescentes com PP e hiperandrogenismo ovárico e associa-se positivamente com os

níveis de androgénios circulantes. Embora os mecanismos que interligam a tríade hiperinsulinemia, PP e hiperandrogenismo ovárico permaneçam desconhecidos, pressupõe-se uma causa genética comum ou uma causa estabelecida precocemente, tal como o atraso de crescimento intra-uterino. Foi sugerido que a programação dos eixos endócrinos ocorre durante períodos críticos do desenvolvimento fetal e é afectada pelo atraso de crescimento intra-uterino<sup>90</sup>.

A PP pode também ocorrer isoladamente, ou seja, sem a presença da hiperinsulinemia e hiperandrogenismo ovárico. Neste caso, parece existir uma maior sensibilidade da unidade pilosebácea aos androgénios, como resultado do aumento da actividade do receptor de androgénios<sup>91</sup>. A prevalência destas formas distintas de PP pode variar em diferentes populações. Os mecanismos patogénicos subjacentes a estas 2 formas de PP podem também ser diferentes. Em crianças com PP e baixo peso ao nascer, hiperandrogenismo e hiperinsulinismo, a concorrência destas características clínicas e bioquímicas pode resultar de uma origem comum como resultado da exposição precoce do feto a um estado de nutrição insuficiente, levando a alterações permanentes no metabolismo da insulina e da distribuição da gordura corporal. Estes são doentes com maior risco de desenvolvimento de SOP e SM na idade adulta e merecem um seguimento cuidadoso<sup>30,92-95</sup>. Estudos de curta duração sugerem que a utilização de um fármaco sensibilizador da insulina nestes doentes, pode prevenir a progressão de PP para SOP<sup>95</sup>. A ausência de estudos que comprovem a segurança e uma relação risco/benefício aceitável restringe a sua utilização apenas a ensaios clínicos<sup>88</sup>.

## CONCLUSÃO

A adrenergia precoce é a principal causa de PP e trata-se de um diagnóstico de exclusão.

A PP é uma entidade relativamente comum cuja apresentação clínica levanta diagnósticos diferenciais benignos ou malignos, que é necessário excluir, pela existência de tratamento específico e pelas implicações no crescimento e desenvolvimento de distúrbios não tratados.

A PP não deve ser encarada com a simples ocorrência antecipada da adrenarca. O diagnóstico de PP deverá orientar, também precocemente, o raciocínio médico, já que se pode estar perante uma criança com maior propensão para distúrbios metabólicos, que poderá merecer uma vigilância mais atenta no que respeita ao estilo de vida e à evolução ponderal. Um ambiente metabólico desfavorável, em que a hiperinsulinemia parece ser o factor-chave, poderá desmascarar factores genéticos ainda não totalmente definidos, predispondo à disfunção ovárica e a outras anomalias endócrinas, que podem agravar ainda mais a condição metabólica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Wilkins L. Proceedings Report of Tenth Annual Meeting of the American Academy of Pediatrics: Memphis, Tenn-Nov 17, 1940. *J Pediatr* 1941;19:259.
2. Talbot NB, Sobel EH, McArthur JW, Crawford JD. Precocious adrenarche. In: Case, Lockwood AS, Brainard M, editors. *Functional endocrinology from birth through adolescence*. Cambridge, MA: Commonwealth Fund, Harvard University Press; 1952. p. 247.
3. Korth-Schutz S, Levine LS, New MI. Evidence for the adrenal source of androgens in precocious adrenarche. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1976;82:242-52.
4. Rosenfield RL. Plasma 17-ketosteroids and 17 $\beta$ -hydroxysteroids in girls with premature development of sexual hair. *J Pediatr* 1971;79:260-6.
5. Pang S. Premature pubarche. *Pediatr Adolesc Endocrinol* 1984;13:173-84.
6. Raine J, Donaldson M, Gregory J, Savage M, Hintz R. *Practical Endocrinology and Diabetes in children*. Second edition. Blackwell Publishing, 2006.
7. Herman-Giddens ME, Slora EJ, Wasserman RC, *et al*. Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in office practice: a study from the pediatric research in office settings network. *Pediatrics* 1997; 99: 505-512.
8. Parker LN, Lifrak ET, Odell WD. A 60,000 molecular weight human pituitary glycopeptide stimulating adrenal androgen secretion. *Endocrinology* 1983;113:2092-6.
9. Mellon SH, Shively JE, Miller WL. Human proopiomelanocortin (79-96), a proposed androgen stimulatory hormone, does not affect steroidogenesis in cultured human fetal adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:19-22.
10. Dickerman Z, Grant DR, Faiman C, Winter JSD. Intraadrenal steroid concentrations in man: zonal differences and developmental changes. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:1031-6.
11. Zhang L, Rodriguez H, Ohno S, Miller WL. Serine phosphorylation of human P450c7 increases 17,20 lyase activity: implications for adrenarche and the polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:10619-23.
12. Ibáñez L, Potau N, Marcos MV, de Zegher F. Corticotropinreleasing hormone as adrenal



- androgen secretagogue. *Pediatr Res* 1999;46:351–3.
13. Ibáñez L, Potau N, Marcos MV, de Zegher F. Corticotropin-releasing hormone: a potent adrenal androgen secretagogue in girls with hyperandrogenism after precocious pubarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4602–6.
  14. Remer T, Manz F. Role of nutritional status in the regulation of adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3936–44.
  15. Ong KK, Potau N, Petry CJ, Jones R, Ness AR, Honour JW, *et al.* Avon Longitudinal Study of Parents and Children Study Team. Opposing influences of prenatal and postnatal weight gain on adrenarche in normal boys and girls. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2647–51.
  16. New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield SE, Pollack MS, *et al.* Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:320–5.
  17. Mermejo LM, Elías LLK, Marui S, Moreira AC, Mendonca BB, de Castro M. Refining hormonal diagnosis of type II 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency in patients with premature pubarche and hirsutism based on HSD3B2 genotyping. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1287–93.
  18. Siegel SF, Finegold DN, Urban MD, McVie R, Lee PA. Premature pubarche: etiological heterogeneity? *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:239–47.
  19. Potau N, Riqué S, Eduardo I, Marcos MV, Ibáñez L. Molecular defects of the CYP21 gene in Spanish girls with isolated precocious pubarche. *Eur J Endocrinol* 2002;147:485–8.
  20. Dacou-Voutetakis C, Dracopoulou M. High incidence of molecular defects of the CYP21 gene in patients with premature adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1570–4.
  21. Ibáñez L, Bonnín MR, Zampolli M, Prat N, Alia PJ, Navarro MA. Usefulness of an ACTH test in the diagnosis of nonclassical 21-hydroxylase deficiency among children presenting with premature pubarche. *Horm Res* 1995;44:51–6.
  22. Ibáñez L, Viridis R, Potau N, Zampolli M, Ghizonni L, Albisu MA, *et al.* Natural history of premature pubarche: an auxological study. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:254–7.
  23. Ibáñez L, Potau N, Dunger D, de Zegher F. 2000 Precocious pubarche in girls and the development of androgen excess. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13(Suppl 5):1261–1263
  24. Sklar CA, Kaplan SL, and Grumbach MM (1980): Evidence for dissociation between adrenarche and gonadarche: Studies in patients with idiopathic precocious puberty, gonadal dysgenesis, isolated gonadotropin deficiency, and constitutionally delayed growth and adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 51:548–556.
  25. Armengaud JB, Charkaluk ML, Trivin C, Tardy V, Bréart G, Brauner R, Chalumeau M. Precocious Pubarche: Distinguishing Late-Onset Congenital Adrenal Hyperplasia from Premature Adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(8):2835–2840.
  26. Rosenfield RL. Normal and almost normal precocious variations in pubertal development. Premature pubarche and premature thelarche revisited. *Horm Res* 1994;41(suppl 2):7–13.
  27. Reiter EO, Saenger P. Premature adrenarche. *Endocrinologist*. 1997;7:85–8.
  28. Potau N, Ibáñez L, Riqué S, Sanchez-Ufarte C, de Zegher F. Pronounced adrenarche and precocious pubarche in boys. *Horm Res* 1999;51:238–41.
  29. Pere A, Perheentupa J, Peter M, Voutilainen R. Follow up of growth and steroids in premature adrenarche. *Eur J Pediatr* 1995;154:346–52.
  30. Ibáñez L, Potau N, Zampolli M, Riqué S, Saenger P, Carrascosa A. Hyperinsulinemia and decreased insulin-like growth factor-binding protein-1 are common features in prepubertal and pubertal girls with a history of premature pubarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2283–8.
  31. Silfen ME, Manibo AM, Ferin M, McMahon DJ, Levine LS, Oberfield SE. Elevated free IGF-I levels in prepubertal Hispanic girls with premature adrenarche: relationship with hyperandrogenism and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:398–403.
  32. Rosenfield RL. Identifying children at risk for polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:787–96.
  33. Rosenfield RL, Lucky AW. Acne, hirsutism, and alopecia in adolescent girls. *Endocrinol Metab Clin N Am* 1993;22:507–32.
  34. Likitmastul S, Cowell CT, Donaghue K, Kreuzmann DJ, Howard NJ, Blades B, *et al.* “Exaggerated adrenarche” in children present-

- ting with premature pubarche. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995;42:265–72.
35. Ibáñez L, Potau N, Virdis R, Zampolli M, Terzi C, Gussinyé M, *et al.* Postpubertal outcome in girls diagnosed of premature pubarche during childhood: increased frequency of functional ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:1599–603.
  36. Rosenfield RL. Editorial: evidence that idiopathic functional adrenal hyperandrogenism is caused by dysregulation of adrenal steroidogenesis and that hyperinsulinemia may be involved. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:878–80. doi:10.1210/jc.81.3.878.
  37. Ibáñez L, de Zegher F. Puberty after prenatal growth restraint. *Mol Cell Endocrinol* 2006;254–255:22–5.
  38. New MI 2004 An update of congenital adrenal hyperplasia. *Ann NY Acad Sci* 1038:14–43
  39. Merke DP, Bornstein SR 2005 Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* 365:2125–2136 Pinto G, Tardy V, Trivin C, Thalassinos C, Lortat-Jacob S, Nihoul-Fekete C,
  40. Morel Y, Brauner R 2003 Follow-up of 68 children with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: relevance of genotype for management. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2624–2633
  41. Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New MI 1985 High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 37:650–667
  42. New MI 2006 Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4205–4214
  43. Jääskeläinen J, Voutilainen R 1997 Growth of patients with 21-hydroxylase deficiency: an analysis of the factors influencing adult height. *Pediatr Res* 41:30–33.
  44. David M, Sempe M, Blanc M, Nicolino M, Forest MG, Morel Y 1994 [Final height in 69 patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency]. *Arch Pediatr* 1:363–367
  45. Kuttann F, Couillin P, Girard F, Billaud L, Vincens M, Boucekkine C, Thalabard JC, Maudelonde T, Spritzer P, Mowszowicz I 1985 Late-onset adrenal hyperplasia in hirsutism. *N Engl J Med* 313:224–231
  46. Deneux C, Tardy V, Dib A, Mornet E, Billaud L, Charron D, Morel Y, Kuttann F 2001 Phenotype-genotype correlation in 56 women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 86:207–213
  47. New MI 1996 Treatment-induced hypoandrogenism in childhood and puberty in females with virilizing (21-hydroxylase deficiency) congenital adrenal hyperplasia. *J Endocrinol* 150 Suppl:S31–S32
  48. Speiser PW. Nonclassic adrenal hyperplasia. *Rev Endocr Metab Disord* (2009) 10:77–82
  49. Ibáñez L, Dimartino-Nardi J, Potau N, Saenger P. Premature adrenarche—normal variant or forerunner of adult disease? *Endocr Rev* 2000; 21:671–696
  50. del Balzo P, Borrelli P, Cambiaso P, Danielli E, Cappa M 1992 Adrenal steroidogenic defects in children with precocious pubarche. *Horm Res* 37:180–184
  51. Hawkins LA, Chasalow FI, Blethen SL 1992 The role of adrenocorticotropic testing in evaluating girls with premature adrenarche and hirsutism/oligomenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 74:248–253
  52. Leite MV, Mendonça BB, Arnhold IJ, Estefan V, Nunes C, Nicolau W, Bloise W 1991 Identification of nonclassical 21-hydroxylase deficiency in girls with precocious pubarche. *J Endocrinol Invest* 14:11–15
  53. Levine LS, Dupont B, Lorenzen F, Pang S, Pollack M, Oberfield S, Kohn B, Lerner A, Cacciari E, Mantero F, Cassio A, Scaroni C, Chiumello G, Rondanini GF, Gargantini L, Giovannelli G, Virdis R, Bartolotta E, Migliori C, Pintor C, Tato L, Barboni F, New MI 1980 Cryptic 21-hydroxylase deficiency in families of patients with classical congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 51:1316–1324
  54. Oberfield SE, Mayes DM, Levine LS 1990 Adrenal steroidogenic function in a black and Hispanic population with precocious pubarche. *J Clin Endocrinol Metab* 70:76–82
  55. Temeck JW, Pang SY, Nelson C, New MI 1987 Genetic defects of steroidogenesis in premature pubarche. *J Clin Endocrinol Metab* 64:609–617
  56. Torok D, Halaš Z, Garami M, Homoki J, Fekete G, Solyom J 2003 Limited value of serum steroid measurements in identification of mild form of 21-hydroxylase deficiency. *Exp*

- Clin Endocrinol Diabetes 111:27–32
57. Balducci R, Boscherini B, Mangiantini A, Morellini M, Toscano V 1994 Isolated precocious pubarche: an approach. *J Clin Endocrinol Metab* 79:582–589
  58. New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield SE, Pollack MS, Dupont B, Stoner E, Levy DJ, Pang S, Levine LS 1983 Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. *J Clin Endocrinol Metab* 57:320–326
  59. Azziz R, Hincapie LA, Knochenhauer ES, Dewailly D, Fox L, Boots LR 1999 Screening for 21-hydroxylase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia among hyperandrogenic women: a prospective study. *Fertil Steril* 72:915–925
  60. Moayeri H, Rabanni A 2003 Nonclassic 21 hydroxylase-deficient adrenal hyperplasia in patients with isolated precocious pubarche. *Acta Medica Iranica* 41:171–174
  61. Zachmann M, Tassinari D, Prader A 1983 Clinical and biochemical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11-hydroxylase deficiency. A study of 25 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 56:222–229
  62. Consensus Statement on 21-Hydroxylase Deficiency from The European Society for Paediatric Endocrinology and The Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. *Horm Res* 2002;58:188–95.
  63. Clayton PE, Miller WL, Oberfield SE, Ritzen EM, Sippell WG, Speiser PW. Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and The European Society for Pediatric Endocrinology. *J Clin Endocrinol. Metab* 2002;87:4048–53.
  64. Lee PD, Winter RJ, Green OC: Virilizing adrenocortical tumors in childhood: eight cases and a review of the literature. *Pediatrics* 1985; 76:437-444.
  65. Phornphutkul C, Okubo T, Wu K, *et al*: Aromatase p450 expression in a feminizing adrenal adenoma presenting as isosexual precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:649-652.
  66. Patil KK, Ransley PG, McCullagh M, *et al*: Functioning adrenocortical neoplasms in children. *BJU Int* 2002; 89:562-565.
  67. Skinner MA, Schlatter MG, Heifetz SA, *et al*: Ovarian neoplasms in children. *Arch Surg* 1993; 128:849-853.
  68. Merras-Salmio L, Vettenranta K, Mottonen M, *et al*: Ovarian granulosa cell tumors of childhood. *Pediatr Hematol Oncol* 2002; 19:145-156.
  69. Wong A, Auersperg N. Ovarian surface epithelium: family history and early events in ovarian cancer. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2003, 1:70.
  70. Bouffet E, Basset T, Chetail N, *et al*: Juvenile granulosa cell tumor of the ovary in infants: a clinicopathologic study of three cases and review of the literature. *J Pediatr Surg* 1997; 32:762-765.
  71. Choong CS, Fuller PJ, Chu S, *et al*: Sertoli-Leydig cell tumor of the ovary, a rare cause of precocious puberty in a 12-month old infant. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:49-56.
  72. Nakashima N, Young RH, Scully RE: Androgenic granulosa cell tumors of the ovary: a clinicopathologic analysis of 17 cases and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 1984; 108:786-791.
  73. Schneider DT, Calaminus G, Wessalowski R, *et al*: Ovarian sex cord-stromal tumors in children and adolescents. *J Clin Oncol* 2003; 21:357-363.
  74. Masur Y, Steffens J, Ziegler M, *et al*: Leydig cell tumors of the testes – clinical and morphologic aspects. *Urologe A* 1996; 35:468-471.
  75. Perilongo G, Rigon F, Murgia A: Oncologic causes of precocious puberty. *Pediatr Hematol Oncol* 1989; 6:331-340.
  76. Diamond FB, Root AW, Hoover DL, *et al*: Hetero- and isosexual pseudoprecocity associated with testicular sex-cord tumors in an 8-year-old male. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1996; 9:407-414.
  77. Richter-Unruh A, Wessels HT, Menken U, *et al*: Male LH-independent sexual precocity in a 3.5 year old boy caused by a somatic activating mutation of the LH receptor in a Leydig cell tumor. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1052-1056.
  78. Liu G, Duranteau L, Carel JC, *et al*: Leydig-cell tumors caused by an activating mutation of the gene encoding the luteinizing hormone receptor. *N Engl J Med* 1999; 341:1731-1736.
  79. Vela Navarrete R, Barat A, Berrocal A, Lopez de Alda A, Quezada F: Testicular adrenal rests tumor: a difficult diagnosis. *Actas Urol Esp* 1990; 14: 146-8.

80. Heimann A, White PF, Riely CA, *et al*: Hepatoblastoma presenting as isosexual precocity: the clinical importance of histologic and serologic parameters. *J Clin Gastroenterol* 1987; 9:105-110.
81. Otsuka T, Ohshima Y, Sunaga Y, *et al*: Primary pulmonary choriocarcinoma in a four month old boy complicated with precocious puberty. *Acta Paediatr Jpn* 1994; 36:404-407.
82. Billmire D, Vinocur C, Rescorla F, *et al*: Malignant mediastinal germ cell tumors: an intergroup study. *J Pediatr Surg* 2001; 36:18-24.
83. Cohen AR, Wilson JA, Sadeghi-Nejad A: Gonadotropin-secreting pineal teratoma causing precocious puberty. *Neurosurgery* 1991; 28:597-602.
84. Rivarola , Belgorosky A, Mendilaharsu H, *et al*: Precocious puberty in children with tumours of the suprasellar and pineal areas: organic central precocious puberty. *Acta Paediatr* 2001; 90:751-756.
85. Englund AT, Geffner ME, Nagal RA, *et al*: Pediatric germ cell and human chorionic gonadotropin-producing tumors: clinical and laboratory features. *Am J Dis Child* 1991; 145:1294-1297.
86. Kukuvitis A, Matte C, Polychronakos C: Central precocious puberty following feminizing right ovarian granulosa cell tumor. *Horm Res* 1995; 44:268-270.
87. Starzyk J, Starzyk B, Bartnik-Mikuta A, *et al*: Gonadotropin releasing hormone-independent precocious puberty in a 5 year old girl with suprasellar germ cell tumor secreting beta-hCG and alpha-fetoprotein. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001; 14:789-796.
88. Ibáñez L, Díaz R, López-Bermejo A, Marcos MV. Clinical spectrum of premature pubarche: Links to metabolic syndrome and ovarian hyperandrogenism. *Rev Endocr Metab Disord* (2009) 10:63–76.
89. Ibáñez L, Valls C, Potau N, Marcos MV, de Zegher F. Polycystic ovary syndrome after precocious pubarche: ontogeny of the low birthweight effect. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;55:667–72.
90. Ibanez L, Potau N, Francois I, de Zegher F. Precocious pubarche, hyperinsulinism, and ovarian hyperandrogenism in girls : relation to reduced fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3558-3562
91. Vottero A, Capelletti M, Giuliodori S, Viani I, Ziveri M, Bernasconi S, Ghizzoni L. Decreased androgen receptor gene methylation in premature pubarche: a novel pathogenetic mechanism? *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Mar;91(3):968-72.
92. Ibáñez L, Potau N, Zampolli M, Prat N, Virdis R, Vicens-Calvet E, *et al*. Hyperinsulinemia in postpubertal girls with a history of premature pubarche and functional ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1237–43.
93. Ibáñez L, Potau N, Chacón P, Pascual P, Carrascosa A. Hyperinsulinemia, dyslipemia and cardiovascular risk in girls with a history of premature pubarche. *Diabetologia* 1998;41:1057–63
94. Ibáñez L, Ong K, de Zegher F, Marcos MV, del Rio L, Dunger D. Fat distribution in non-obese girls with and without precocious pubarche: central adiposity related to insulinemia and androgenemia from pre-puberty to post-menarche. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003;58:372–9.
95. Ibanez L, Valls C, Marcos MV, Ong K, Dunger DB, De Zegher F. Insulin sensitization for girls with precocious pubarche and with risk for polycystic ovary syndrome: effects of prepubertal initiation and postpubertal discontinuation of metformin treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Sep;89(9):4331-7.

# Obesidade: O Papel das Melanocortinas na regulação da Homeostasia Energética

## *Obesity: the role of melanocortins in the regulation of energy homeostasis*

Adriana Rodrigues<sup>1</sup>, Henrique Almeida<sup>1</sup>, Alexandra Gouveia<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Experimental da Faculdade de Medicina e IBMC- Instituto de Biologia Celular e Molecular da Universidade do Porto

<sup>2</sup> Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

Correspondência: Alexandra Gouveia > Departamento de Biologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto > Alameda Prof. Hernâni Monteiro > 4200-319 PORTO > agouveia@med.up.pt

### RESUMO

Nas últimas décadas a obesidade revelou-se um dos maiores problemas de saúde pública dos países desenvolvidos, sendo um factor de risco para várias doenças como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e alguns tipos de cancro. Um dos mecanismos directamente relacionados com a regulação da homeostasia energética integra o sistema das melanocortinas<sup>1</sup>, também envolvido noutros processos biológicos como pigmentação e esteroidogénese<sup>2-3</sup>. Ao nível do sistema nervoso central (SNC), o sistema das melanocortinas é um dos mecanismos neuropeptidérgicos melhor caracterizados no que diz respeito ao controlo da ingestão alimentar. Para além desta acção central, as melanocortinas actuam também numa variedade de tecidos periféricos, incluindo o tecido adiposo. O conhecimento da acção periférica das melanocortinas tem vindo a aumentar com novos dados promissores ao desenvolvimento de terapias eficazes no tratamento da obesidade. É nosso objectivo apresentar uma revisão detalhada sobre o papel das melanocortinas na regulação da homeostasia energética recorrendo a evidências e trabalhos científicos publicados nos últimos anos.

### PALAVRAS-CHAVE

Melanocortinas; Obesidade; Adipócito; Homeostasia energética.

### SUMMARY

*Obesity is one of the greatest public health problems of the 21st century, with major consequences in diabetes, cardiovascular diseases and cancer. It is well known that the melanocortin system is an important regulator of body energy homeostasis<sup>1</sup>. In fact, the role of the melanocortin system in the regulation of energy balance at the central nervous system has been extensively studied, although melanocortins are also involved in other biological processes such as pigmentation or steroidogenesis<sup>2-3</sup>. In addition, it has also been demonstrated that melanocortins act in a variety of peripheral tissues, including the adipose tissue. The study of peripheral melanocortin effects has been increased and challenges the MCRs as promising targets for the pharmacological treatment of obesity. The role of melanocortins on energy homeostasis is reviewed in this manuscript which describes up to date scientific data.*

### KEYWORDS

*Melanocortins; Obesity; Adipocyte; Energy homeostasis.*

## INTRODUÇÃO

A obesidade é actualmente considerada um problema de saúde, endémico dos países desenvolvidos. Nos Estados Unidos da América, em 2007-2008, verificou-se que 32% dos homens e 35% das mulheres apresentava obesidade (segundo o critério de índice de massa corporal (IMC)  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>)<sup>4</sup>. Na Europa, a obesidade apresenta uma maior prevalência nos países do sul, centro e Europa oriental, sendo este valor genericamente mais baixo nos países Nórdicos e da Europa Ocidental<sup>3,5</sup>. A Inglaterra manifestase como o país Europeu com maior prevalência de obesidade<sup>3</sup>.

Portugal não representa uma excepção a este cenário, tal como demonstrado em alguns trabalhos de estudo da prevalência da obesidade<sup>6-7</sup>. Determinou-se que a prevalência do excesso de peso (IMC entre 25,0 e 29,9 kg/m<sup>2</sup>) e da obesidade (IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) em Portugal entre 2003 e 2005 era de 53,6%, valor superior ao obtido no estudo realizado entre 1995-1998 que a situava nos 49,6%<sup>6</sup>. Ao considerar apenas os casos de obesidade, este trabalho revelou que constituíam cerca de 14,2% da população.

Apesar de todos os alertas, a verdade é que a prevalência da obesidade tem vindo a aumentar. Torna-se assim fundamental o desenvolvimento de estratégias de prevenção e terapias mais eficazes. Neste campo, a

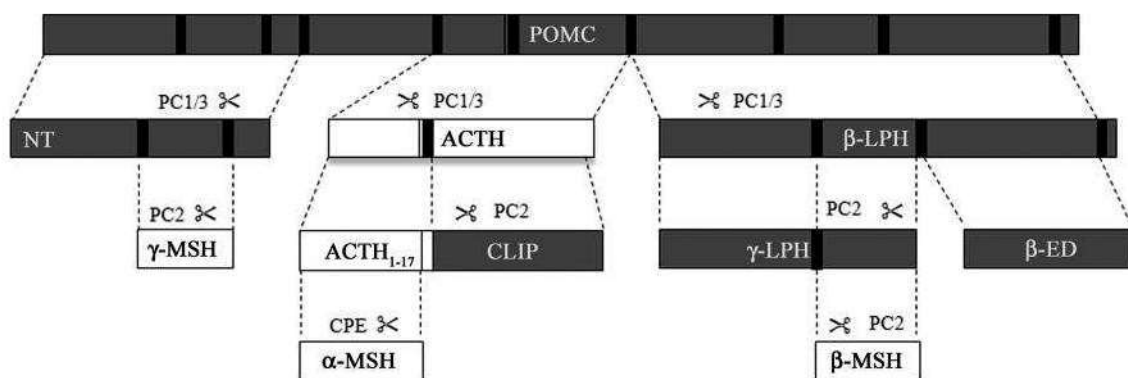
compreensão da regulação da homeostasia energética pelo sistema das melanocortinas poderá auxiliar o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

## CORPO DA REVISÃO

### O SISTEMA DAS MELANOCORTINAS

As melanocortinas são neuropéptidos derivados da poliproteína pró-opiomelanocortina (POMC), expressa no núcleo arqueado do hipotálamo, núcleo do tracto solitário, hipófise e outros tecidos periféricos<sup>8,9</sup>. Após clivagem proteolítica da POMC formam-se as várias melanocortinas, nomeadamente a hormona adrenocorticotrópica (ACTH) e as hormonas alfa, beta e gama estimuladora de melanócitos (MSH) (Figura 1). O sistema das melanocortinas engloba ainda dois antagonistas endogenamente expressos, a Agouti e a Proteína Relacionada com a Agouti (AgRP)<sup>10-11</sup>. Ao nível da periferia celular estes neuropéptidos são reconhecidos por cinco receptores das melanocortinas (MCRs), classificados de 1 até 5 (MC1R-MC5R). Os MCRs pertencem à família dos receptores com sete domínios membranares associados às proteínas Gs (GPCRs) e, topologicamente, possuem a extremidade amino com localização extracelular, sete regiões transmembranares e a

FIGURA 1



Processamento da POMC com conseqüente formação das diferentes melanocortinas (Indicadas nos rectângulos brancos). NT- Extremidade amino; CLIP- «corticotropin-like-intermediate lobe peptide»; ED- endorfina; LPH- Lipotropina; PC- Pro-hormona convertase. Adaptado de <sup>41,91</sup>.

TABELA I: Receptores das melanocortinas: afinidade para as diferentes melanocortinas e antagonistas, distribuição tecidual e funções (adaptado de<sup>13, 89-90</sup>).

MCRs	Afinidade para as melanocortinas	Antagonista Endógeno	Locais de Expressão	Função
MC1R	$\alpha$ -MSH = ACTH = $\beta$ -MSH > $\gamma$ -MSH	Agouti	Melanócitos, células endoteliais, fibroblastos, monócitos, glia, queratinócitos	Pigmentação, anti-inflamatório, anti-pirético
MC2R	ACTH	Agouti	Glândula supra-renal, adipócitos de murganho	Esteroidogénese, lipólise induzida pelo stress
MC3R	$\gamma$ -MSH = ACTH = $\beta$ -MSH $\geq$ $\alpha$ -MSH	AgRP	Sistema nervoso central, coração, macrófagos	Homeostasia energética, anti-inflamatório, cardiovascular
MC4R	$\alpha$ -MSH $\geq$ ACTH > $\beta$ -MSH > $\gamma$ -MSH	AgRP, Agouti	Sistema Nervoso Central	Regulação da ingestão alimentar e homeostasia energética, disfunção eréctil, anti-pirético
MC5R	$\alpha$ -MSH $\geq$ ACTH > $\beta$ -MSH > $\gamma$ -MSH	Agouti	Glândulas exócrinas, hipófise, pele, glândula supra-renal, adipócito, músculo liso e esquelético, medula óssea, baço, nódulos linfáticos, timo, gónadas, útero, pulmões, fígado, estômago, esófago, rim, glândulas mamárias, monócitos, granulócitos, linfócitos, cerebelo, medula	Regulação de secreção exócrina, função imunoreguladora, lipólise

extremidade carboxílica no citosol. É consensualmente aceite que os GPCRs são sintetizados no retículo endoplasmático e subsequentemente endereçados para a membrana citoplasmática. Após activação pelos agonistas específicos, a resposta mediada pelos GPCRs é rapidamente atenuada por um mecanismo de dessensitização que normalmente envolve a internalização dos receptores. Depois de internalizados, os GPCRs podem ser reciclados para a membrana plasmática ou podem ser degradados no lisossoma<sup>12</sup>.

Os MCRs diferem entre si na distribuição tecidual e na afinidade de ligação às diferentes melanocortinas e antagonistas<sup>13</sup> (Tabela I):

- O MC1R é expresso em diferentes tipos de células da pele, incluindo melanócitos, queratinócitos e células epiteliais e também em células de resposta inflamatória. Funcionalmente o MC1R é responsável pela regulação da melanogénese e apresenta efeitos imunomodulatórios e anti-inflamatórios<sup>14</sup>.
- O MC2R tem a particularidade de interaccionar apenas com a ACTH, não respondendo às outras melanocortinas. Este receptor é expresso quase exclusivamente nas células do córtex da glândula supra-renal onde medeia a acção da ACTH na regulação da este-

roidogénese<sup>15</sup>. O MC2R foi também detectado na pele<sup>16</sup> e em adipócitos<sup>17</sup>, onde exhibe um papel importante na regulação do processo de lipólise em resposta à ACTH<sup>18</sup>.

- O MC3R é predominantemente expresso no SNC, embora níveis mais baixos deste receptor sejam também detectados na placenta, estômago e pâncreas<sup>19</sup>. O MC3R parece apresentar um papel importante na regulação da homeostasia energética, uma vez que os murganhos «knockout» para o MC3R desenvolvem uma síndrome metabólica subtil sem aumento de peso e hiperinsulinemia, mas com aumento de massa gorda, hipofagia e hipoactividade<sup>20-21</sup>. Estranhamente este receptor parece ter um papel duplo na regulação da homeostasia energética pois actua como um auto-inibidor em neurónios hipotalâmicos que também sintetizam POMC<sup>22</sup>. Ou seja, verificou-se que existe uma co-expressão de POMC e MC3R em alguns neurónios e que existe uma diminuição da actividade destes neurónios após a aplicação de um agonista específico do MC3R<sup>23</sup>. O papel fisiológico do MC3R no controlo da homeostasia energética é assim, neste momento, ainda enigmático.

- O MC4R é vastamente expresso no SNC, nomeadamente no hipotálamo, hipocampo, tálamo e medula espinhal<sup>24</sup>. O envolvimento directo do MC4R na regulação da homeostasia energética<sup>25</sup> é suportado pelo fenótipo de obesidade dos ratinhos «knockout» para este gene<sup>26</sup>. Efectivamente, os ratinhos MC4R -/- apresentam um aumento da ingestão alimentar, obesidade severa, hiperinsulinemia e hiperleptinemia<sup>26</sup>. Outras funções têm sido atribuídas ao MC4R, nomeadamente regulação da função erétil<sup>27</sup> e dor<sup>28</sup>.
- O último receptor a ser clonado foi o MC5R, uma proteína que exhibe baixos níveis de expressão em praticamente todos os tecidos periféricos (Tabela I)<sup>13</sup>. Os murganhos «knockout» para o MC5R apresentam alterações na termo-regulação e uma menor impermeabilização da pele à água, resultante de uma diminuta produção de lípidos sebáceos<sup>29</sup>. Nestes animais, o MC5R parece também modular a síntese e /ou libertação de feromonas<sup>30-32</sup>. No tecido muscular esquelético, o MC5R foi directamente implicado na regulação da oxidação em beta de ácidos gordos após um estímulo de alfa-MSH<sup>33</sup>.

Como referido anteriormente, o sistema das melanocortinas compreende ainda dois antagonistas, a Agouti e a AgRP. A Agouti é sintetizada nos folículos pilosos e, de uma forma parácrina, antagoniza a acção da alfa-MSH sobre o MC1R expresso nos melanócitos<sup>11</sup>. A AgRP é sintetizada no hipotálamo e actua como um antagonista do MC3R e MC4R<sup>10</sup>. Os ratinhos com uma sobre-expressão constitutiva das proteínas Agouti ou AgRP desenvolvem aumento do peso corporal e hiperinsulinemia<sup>34-35</sup>. No entanto, os ratinhos «knockout» para a AgRP apresentam peso corporal e adiposidade normais, fenótipo que levantou algumas dúvidas acerca da importância dessa proteína na

regulação da homeostasia energética<sup>36</sup>. Dados mais conclusivos surgiram de vários estudos independentes que, recorrendo a abordagens experimentais diferentes, inativaram apenas pós-natal os neurónios que expressam a AgRP. Nestes animais verificou-se hipofagia, diminuição do peso e da adiposidade, o que levou a atribuir a ausência de fenótipo nos «knockouts» a um fenómeno de compensação durante o desenvolvimento embrionário<sup>3, 37</sup>.

Em conclusão, o sistema das melanocortinas inclui vários MCRs que, in vivo, apresentam a propriedade única de, em adição a uma variedade de agonistas, ainda interactuarem com dois antagonistas. Este mecanismo provavelmente constitui uma forma de regulação precisa da actividade dos MCRs e, consequentemente, do funcionamento do sistema melanocortínico.

#### VARIANTES GENÉTICAS DO SISTEMA DAS MELANOCORTINAS

Em humanos, a primeira evidência do envolvimento das melanocortinas no controlo da ingestão alimentar surgiu na descrição de dois doentes que desenvolveram uma obesidade muito precoce e que se revelaram possuir mutações no gene que codifica a POMC<sup>38-41</sup>. Igualmente, os murganhos «knockout» do *Pomc* também são obesos, hiperfágicos e apresentam ainda deficiências na pigmentação e função da glândula supra-renal, o que demonstra alterações adicionais na função dos MC1R e MC2R, respectivamente<sup>42-43</sup>. Relativamente às enzimas que clivam a POMC de modo a se formarem as diversas melanocortinas (Figura 1), verificou-se que indivíduos com mutações no gene que codifica a PC1 (pro-hormona convertase 1) desenvolvem obesidade<sup>44</sup>, facto consonante com o fenótipo similar exibido pelos murganhos *Pc1* -/-<sup>45</sup>.

Foram também descritos polimorfismos nas regiões codificante e promotora do gene que codifica a AgRP<sup>46,47</sup>, mais frequentes



entre indivíduos com anorexia nervosa<sup>48</sup>. Os indivíduos com estas alterações apresentam baixo peso e uma preferência por comida com baixo teor em gordura<sup>49</sup>.

Ao nível dos receptores das melanocortinas, nos indivíduos com mutações no MC3R e MC4R observam-se efeitos na desregulação da homeostasia energética. De facto foram encontradas alterações no gene que codifica o MC3R em alguns indivíduos obesos<sup>50-51</sup>. No entanto, estudos com um elevado número de indivíduos mostraram não existir diferença na prevalência de mutações no MC3R em obesos versus controlos não-obesos<sup>52</sup>. Assim, não existe evidência suficiente para considerar que o MC3R exibe um papel directo na incidência da obesidade humana.

Relativamente ao MC4R os dados são muito mais concretos e neste momento não existem dúvidas quanto ao seu envolvimento directo na obesidade humana. Verificou-se que mutações no MC4R representam a causa mais frequente (entre 3 a 6%) de obesidade monogénica<sup>53-54</sup> e, depois de realizados estudos em diferentes populações, estão neste momento descritas mais de 150 mutações distintas no gene que codifica o MC4R<sup>25</sup>. Uma análise particular na população do Quebec mostrou uma associação entre o fenótipo de obesidade e alterações não só no gene que codifica o MC4R mas também o MC5R<sup>55</sup>.

Recentemente foi descrita a presença de auto-anticorpos anti-MC4R em indivíduos obesos<sup>56-57</sup>. Verificou-se também que após purificação destes auto-anticorpos e administração em ratos ocorria um aumento da ingestão alimentar em 48 horas<sup>56</sup>. Estes auto-anticorpos poderão assim perturbar o normal funcionamento do MC4R e provocar obesidade. Por todos estes dados, a indústria farmacêutica tem revelado grande interesse no estudo do papel do MC4R no controlo da ingestão alimentar e do dispêndio energético, como um potencial alvo no tratamento da obesidade.

## REGULAÇÃO CENTRAL DA HOMEOSTASIA ENERGÉTICA

O papel das melanocortinas ao nível da regulação central do balanço energético tem sido intensamente estudado através de ensaios farmacológicos, modelos animais com mutações espontâneas ou induzidas e analisando dados genéticos em patologias humanas.

Em neurónios hipotalâmicos, a expressão da POMC é regulada por diversas hormonas (leptina, grelina, insulina), nutrientes (glicose, leucina) e citocinas (Il-18)<sup>1</sup>. Um dos mecanismos melhor estudados compreende a regulação mediada pela leptina, segregada pelos adipócitos proporcionalmente à percentagem de massa gorda armazenada nestas células. Nas duas classes distintas de neurónios do núcleo arqueado que expressam isoladamente POMC e AgRP também existem os receptores da leptina<sup>10,58</sup>. De uma forma sucinta, a leptina libertada pelos adipócitos vai inibir a expressão de AgRP e estimular a síntese de POMC e, conseqüentemente, promover a libertação de alfa-MSH pelos neurónios melanocortinérgicos no hipotálamo<sup>22,59-60</sup>. Conseqüentemente o alfa-MSH actua sobre o MC3R e MC4R expressos nestes neurónios inibindo a ingestão alimentar e aumentando o dispêndio energético.

Nos anos 80, o papel das melanocortinas ao nível do SNC foi intensamente estudado e relacionado com o controlo da ingestão alimentar e da massa corporal. Administrações intracerebroventriculares de alfa-MSH e MTII (análogo do alfa-MSH) em roedores e primatas resultam numa redução significativa nos níveis de ingestão alimentar e do peso corporal<sup>61-63</sup>. No entanto, estes efeitos não são observados nos ratinhos «knockout» para o MC4R<sup>64</sup>. Por outro lado, injeções centrais de AgRP ou SHU9119, um antagonista dos MC3R e MC4R, contrariam o efeito hipofágico do alfa-MSH/MTII, aumentando a ingestão ali-

mentar e diminuindo o dispêndio energético e a termogénese<sup>65-67</sup>.

A acção das melanocortinas na regulação da ingestão alimentar é indiscutível, mas os efeitos podem ocorrer a diversos níveis: selecção da comida e duração ou frequência da refeição<sup>68</sup>. De facto verificou-se que o tratamento de ratos com MTII reduz o tamanho e a duração da refeição e não a frequência ou intervalos entre as refeições<sup>69</sup>. Este tratamento induz também uma preferência palativa, uma vez que os animais diminuem mais a ingestão de gordura relativamente a carboidratos e proteínas<sup>70</sup>. Igualmente, os ratinhos com sobre-expressão de AgRP ou «knockouts» MC4R e POMC apresentam uma preferência por ingestão de uma dieta rica em gordura<sup>41, 71</sup>.

#### ACÇÃO DAS MELANOCORTINAS NO TECIDO ADIPOSEO

A regulação da ingestão alimentar assim como do dispêndio energético envolvem processos de sinalização celular tanto ao nível do SNC como a nível periférico, embora o mecanismo de acção e a função das melanocortinas em tecidos periféricos permanecem largamente desconhecidos. Sabe-se que a administração periférica de análogos das melanocortinas em ratinhos obesos e «knockout» POMC conduz a uma redução do peso destes animais, através de um efeito directo nos adipócitos<sup>61, 72-73</sup>. Em humanos também se mostrou que os níveis plasmáticos de alfa-MSH se encontram elevados em indivíduos obesos quando comparados com indivíduos controlo, o que sugere algum envolvimento das melanocortinas a nível periférico na regulação do balanço energético<sup>74-75</sup>. No entanto, existem outros dados na literatura, mostrando uma falta de correlação entre os níveis plasmáticos de alfa-MSH e marcadores de obesidade<sup>76-78</sup>.

O conhecimento sobre os receptores que especificamente medeiam o efeito das melanocortinas nos tecidos periféricos é bastante

diminuto. No tecido adiposo de pacientes obesos, estudos quantitativos de PCR em tempo real mostraram que os níveis de mRNA do MC1R estavam aumentados na gordura subcutânea, mas não na gordura abdominal<sup>79</sup>. Neste estudo, os autores referiram que o tecido adiposo humano possui níveis baixos de MC4R e MC5R mas não possui quantidade detectável de MC2R e MC3R. Contudo a expressão dos diferentes MCRs no tecido adiposo humano é uma matéria não consensual, uma vez que na literatura surgem resultados muito diversos, em oposição aos descritos anteriormente: Chhajlani *et al* reportou a presença de MC5R e MC1R na gordura abdominal<sup>80</sup>; Chagnon *et al* descreve adicionalmente a presença de MC4R<sup>55</sup>; Smith *et al* apenas detectou MC1R e MC2R<sup>81</sup>. Para esta divergência de resultados certamente contribuem as diferenças no tipo de tecido adiposo recolhido na amostragem e sensibilidade das metodologias utilizadas. Há por conseguinte muito espaço de conhecimento por preencher nos mecanismos de acção das melanocortinas no tecido adiposo.

Contrariamente à divergência de resultados em tecido adiposo humano, os receptores das melanocortinas expressos em roedores reúnem consenso, estando apenas descrita a presença de MC4R e MC5R em adipócitos de rato<sup>82</sup> e MC2R e MC5R em adipócitos de murganho<sup>17-18</sup>. Nos adipócitos de murganho 3T3-L1 verificou-se que tratamentos com alfa-MSH promovem aumento dos níveis de lipólise<sup>83</sup>. Uma vez que dos dois receptores expressos nesta linhagem (MC2R e MC5R) apenas o MC5R apresenta afinidade para o alfa-MSH, surge a hipótese que este receptor poderá mediar os efeitos desta melanocortina no tecido adiposo. Cho *et al*<sup>83</sup> demonstrou também que o aumento da lipólise provocado pelo alfa-MSH era dependente das vias de sinalização cAMP-PKA e ERK1/2, as quais caracterizamos recentemente como vias mediadoras da acção específica do MC5R em células humanas

HEK293 com expressão estável do MC5R-GFP<sup>84</sup>. Apesar de não existirem evidências directas, estes dados favorecem o envolvimento do MC5R na regulação do metabolismo lipídico no tecido adiposo.

## ENSAIOS CLÍNICOS

Vários estudos estão a ser desenvolvidos com o intuito de promover a síntese de compostos selectivos para o sistema das melanocortinas, direccionados para o uso clínico na terapêutica da obesidade (e também de condições de caquexia e anorexia). O alvo mais comum tem sido o MC4R mas a indústria farmacêutica tem encontrado uma grande dificuldade em obter compostos com afinidade exclusiva para o MC4R, que muitas vezes exibem interacções cruzadas com outros MCRs<sup>2</sup>. Até ao presente, os compostos desenvolvidos foram apenas utilizados em ensaios clínicos para tratamento de disfunção erétil<sup>85-86</sup> e disfunção sexual feminina<sup>87</sup>. Os ensaios de fase II com bremelatonide, um derivado do MT-II, mostraram benefícios em homens com disfunção erétil que não respondiam à terapia com sildenafil<sup>85</sup> e também em mulheres com disfunção sexual<sup>87</sup>. Embora os efeitos secundários reportados não fossem muito relevantes verificaram-se alterações cardiovasculares de modo que a fase III dos ensaios clínicos foi atrasada e aguarda autorização da "Food and Drug Administration" (consultar <http://www.palatin.com/products/bremelatonide.asp>). Sendo estes efeitos secundários toleráveis com uma utilização ocasional da bremelatonide, a preceder actividade sexual, a administração crónica, necessária ao tratamento da obesidade, não é aceitável, razão porque esta droga não constitui uma opção na terapia da obesidade. Recentemente foi descrito um agonista selectivo do MC4R, o MK-0493, mas da sua administração a indivíduos obesos resultou uma ligeira diminuição, não significativa, do peso corporal<sup>88</sup>. Os autores concluíram que a utilização deste

agonista do MC4R também não constitui uma abordagem eficaz como terapia anti-obesidade. De uma forma geral, os ensaios clínicos efectuados até agora envolveram sempre compostos que afectam ou interagem com o sistema central das melanocortinas, o que implica uma amplitude grande de efeitos secundários. A utilização de compostos que actuem a nível periférico poderá por isso constituir uma alternativa favorável ao tratamento da obesidade.

## CONCLUSÃO

O sistema das melanocortinas constitui uma via fundamental na regulação do balanço energético, frequentemente associado a obesidade através da modulação da resposta hipotalâmica. Está claramente demonstrado que a administração de melanocortinas quer a nível central, quer periférico, promove a diminuição do peso corporal, da ingestão alimentar e aumenta o dispendio energético<sup>1</sup>. Estes dados potenciam o sistema melanocortinérgico como um alvo no tratamento de distúrbios alimentares.

Embora muitas questões permaneçam por responder, o aumento do conhecimento dos mecanismos hormonais, moleculares e celulares envolvidos na regulação da homeostasia energética permite abrir novos caminhos à indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novas drogas com fim ao tratamento da obesidade.

## AGRADECIMENTOS

Os nossos agradecimentos à Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo e à Abbott Laboratórios pela atribuição da Bolsa de Investigação em Obesidade 2009 e à POCI 2010, FSE e Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo financiamento da Adriana Rodrigues (SFRH/BD/41024/2007).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mountjoy KG. Functions for pro-opiomelanocortin-derived peptides in obesity and diabetes. *Biochem J* 2010;428(3):305-24.
2. Wikberg JE, Mutulis F. Targeting melanocortin receptors: an approach to treat weight disorders and sexual dysfunction. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(4):307-23.
3. Garfield AS, Lam DD, Marston OJ, Przydzial MJ, Heisler LK. Role of central melanocortin pathways in energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20(5):203-15.
4. Ford ES, Li C, Zhao G, Tsai J. Trends in obesity and abdominal obesity among adults in the United States from 1999-2008. *Int J Obes (Lond)* 2010.
5. Berghofer A, Pischon T, Reinhold T, Apovian CM, Sharma AM, Willich SN. Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *BMC Public Health* 2008;8:200.
6. do Carmo I, Dos Santos O, Camolas J, et al. Overweight and obesity in Portugal: national prevalence in 2003-2005. *Obes Rev* 2008;9(1):11-9.
7. Camoes M, Lopes C, Oliveira A, Santos AC, Barros H. Overall and central obesity incidence in an urban Portuguese population. *Prev Med* 2010;50(1-2):50-5.
8. Gee CE, Chen CL, Roberts JL, Thompson R, Watson SJ. Identification of proopiomelanocortin neurones in rat hypothalamus by in situ cDNA-mRNA hybridization. *Nature* 1983;306(5941):374-6.
9. Jacobowitz DM, O'Donohue TL. alpha-Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75(12):6300-4.
10. Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, et al. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 1997;278(5335):135-8.
11. Lu D, Willard D, Patel IR, et al. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 1994;371(6500):799-802.
12. Tan CM, Brady AE, Nickols HH, Wang Q, Limbird LE. Membrane trafficking of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:559-609.
13. Getting SJ. Targeting melanocortin receptors as potential novel therapeutics. *Pharmacol Ther* 2006;111(1):1-15.
14. Garcia-Borron JC, Sanchez-Laorden BL, Jimenez-Cervantes C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res* 2005;18(6):393-410.
15. Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 1992;257(5074):1248-51.
16. Slominski A, Ermak G, Mihm M. ACTH receptor, CYP11A1, CYP17 and CYP21A2 genes are expressed in skin. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(7):2746-9.
17. Boston BA, Cone RD. Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line. *Endocrinology* 1996;137(5):2043-50.
18. Boston BA. The role of melanocortins in adipocyte function. *Ann N Y Acad Sci* 1999;885:75-84.
19. Gantz I, Konda Y, Tashiro T, et al. Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J Biol Chem* 1993;268(11):8246-50.
20. Butler AA, Kesterson RA, Khong K, et al. A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology* 2000;141(9):3518-21.
21. Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, et al. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet* 2000;26(1):97-102.
22. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 2001;411(6836):480-4.
23. Cone RD. Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr Rev* 2006;27(7):736-49.
24. Mountjoy KG, Wild JM. Melanocortin-4 receptor mRNA expression in the developing autonomic and central nervous systems. *Brain Res Dev Brain Res* 1998;107(2):309-14.
25. Tao YX. The Melanocortin-4 Receptor: Physiology, Pharmacology, and Pathophysiology. *Endocr Rev* 2010.
26. Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 1997;88(1):131-41.
27. Martin WJ, MacIntyre DE. Melanocortin recep-

- tors and erectile function. *Eur Urol* 2004;45(6):706-13.
28. Starowicz K, Przewlocka B. The role of melanocortins and their receptors in inflammatory processes, nerve regeneration and nociception. *Life Sci* 2003;73(7):823-47.
29. Chen W, Kelly MA, Opitz-Araya X, Thomas RE, Low MJ, Cone RD. Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell* 1997;91(6):789-98.
30. Morgan C, Cone RD. Melanocortin-5 receptor deficiency in mice blocks a novel pathway influencing pheromone-induced aggression. *Behav Genet* 2006;36(2):291-300.
31. Morgan C, Thomas RE, Cone RD. Melanocortin-5 receptor deficiency promotes defensive behavior in male mice. *Horm Behav* 2004;45(1):58-63.
32. Morgan C, Thomas RE, Ma W, Novotny MV, Cone RD. Melanocortin-5 receptor deficiency reduces a pheromonal signal for aggression in male mice. *Chem Senses* 2004;29(2):111-5.
33. An JJ, Rhee Y, Kim SH, et al. Peripheral effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone on fatty acid oxidation in skeletal muscle. *J Biol Chem* 2007;282(5):2862-70.
34. Klebig ML, Wilkinson JE, Geisler JG, Woychik RP. Ectopic expression of the agouti gene in transgenic mice causes obesity, features of type II diabetes, and yellow fur. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(11):4728-32.
35. Graham M, Shutter JR, Sarmiento U, Sarosi I, Stark KL. Overexpression of Agrt leads to obesity in transgenic mice. *Nat Genet* 1997;17(3):273-4.
36. Qian S, Chen H, Weingarh D, et al. Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. *Mol Cell Biol* 2002;22(14):5027-35.
37. Flier JS. AgRP in energy balance: Will the real AgRP please stand up? *Cell Metab* 2006;3(2):83-5.
38. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 1998;19(2):155-7.
39. Krude H, Biebermann H, Schnabel D, et al. Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(10):4633-40.
40. Challis BG, Pritchard LE, Creemers JW, et al. A missense mutation disrupting a dibasic prohormone processing site in pro-opiomelanocortin (POMC) increases susceptibility to early-onset obesity through a novel molecular mechanism. *Hum Mol Genet* 2002;11(17):1997-2004.
41. Coll AP, Loraine Tung YC. Pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptides and the regulation of energy homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 2009;300(1-2):147-51.
42. Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med* 1999;5(9):1066-70.
43. Challis BG, Coll AP, Yeo GS, et al. Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY(3-36). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(13):4695-700.
44. Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, et al. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* 1997;16(3):303-6.
45. Lloyd DJ, Bohan S, Gekakis N. Obesity, hyperphagia and increased metabolic efficiency in Pc1 mutant mice. *Hum Mol Genet* 2006;15(11):1884-93.
46. Loos RJ, Rankinen T, Rice T, et al. Two ethnic-specific polymorphisms in the human Agouti-related protein gene are associated with macronutrient intake. *Am J Clin Nutr* 2005;82(5):1097-101.
47. Bonilla C, Panguluri RK, Taliaferro-Smith L, et al. Agouti-related protein promoter variant associated with leanness and decreased risk for diabetes in West Africans. *Int J Obes (Lond)* 2006;30(4):715-21.
48. Vink T, Hinney A, van Elburg AA, et al. Association between an agouti-related protein gene polymorphism and anorexia nervosa. *Mol Psychiatry* 2001;6(3):325-8.
49. Marks DL, Boucher N, Lanouette CM, et al. Ala67Thr polymorphism in the Agouti-related peptide gene is associated with inherited leanness in humans. *Am J Med Genet A* 2004;126A(3):267-71.
50. Lee YS, Poh LK, Loke KY. A novel melanocortin

- 3 receptor gene (MC3R) mutation associated with severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(3):1423-6.
51. Rached M, Buronfosse A, Begeot M, Penhoat A. Inactivation and intracellular retention of the human I183N mutated melanocortin 3 receptor associated with obesity. *Biochim Biophys Acta* 2004;1689(3):229-34.
  52. Calton MA, Ersoy BA, Zhang S, et al. Association of functionally significant Melanocortin-4 but not Melanocortin-3 receptor mutations with severe adult obesity in a large North American case-control study. *Hum Mol Genet* 2009;18(6):1140-7.
  53. Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest* 2000;106(2):253-62.
  54. Lubrano-Berthelier C, Dubern B, Lacorte JM, et al. Melanocortin 4 receptor mutations in a large cohort of severely obese adults: prevalence, functional classification, genotype-phenotype relationship, and lack of association with binge eating. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(5):1811-8.
  55. Chagnon YC, Chen WJ, Perusse L, et al. Linkage and association studies between the melanocortin receptors 4 and 5 genes and obesity-related phenotypes in the Quebec Family Study. *Mol Med* 1997;3(10):663-73.
  56. Peter JC, Bekel A, Lecourt AC, et al. Anti-melanocortin-4 receptor autoantibodies in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(3):793-800.
  57. Mohan C, Agarwal AK. Melanocortin-4-receptor autoantibodies: a new player in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(3):757-9.
  58. Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 1997;138(10):4489-92.
  59. Mizuno TM, Kleopoulos SP, Bergen HT, Roberts JL, Priest CA, Mobbs CV. Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes* 1998;47(2):294-7.
  60. Mizuno TM, Mobbs CV. Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. *Endocrinology* 1999;140(2):814-7.
  61. Pierroz DD, Ziotopoulou M, Ungsuan L, Moschos S, Flier JS, Mantzoros CS. Effects of acute and chronic administration of the melanocortin agonist MTII in mice with diet-induced obesity. *Diabetes* 2002;51(5):1337-45.
  62. McMinn JE, Wilkinson CW, Havel PJ, Woods SC, Schwartz MW. Effect of intracerebroventricular alpha-MSH on food intake, adiposity, c-Fos induction, and neuropeptide expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;279(2):R695-703.
  63. Koepler FH, Grove KL, Schiffmacher A, Smith MS, Cameron JL. Central melanocortin receptors mediate changes in food intake in the rhesus macaque. *Endocrinology* 2001;142(6):2586-92.
  64. Marsh DJ, Hollopeter G, Huszar D, et al. Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat Genet* 1999;21(1):119-22.
  65. Rossi M, Kim MS, Morgan DG, et al. A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 1998;139(10):4428-31.
  66. Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 1997;385(6612):165-8.
  67. Small CJ, Kim MS, Stanley SA, et al. Effects of chronic central nervous system administration of agouti-related protein in pair-fed animals. *Diabetes* 2001;50(2):248-54.
  68. Hillebrand JJ, Kas MJ, Adan RA. To eat or not to eat; regulation by the melanocortin system. *Physiol Behav* 2006;89(1):97-102.
  69. Williams DL, Grill HJ, Weiss SM, Baird JP, Kaplan JM. Behavioral processes underlying the intake suppressive effects of melanocortin 3/4 receptor activation in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 2002;161(1):47-53.
  70. Samama P, Rumennik L, Grippio JF. The melanocortin receptor MCR4 controls fat consumption. *Regul Pept* 2003;113(1-3):85-8.
  71. Adan RA, Tiesjema B, Hillebrand JJ, la Fleur SE, Kas MJ, de Krom M. The MC4 receptor and control of appetite. *Br J Pharmacol* 2006;149(7):815-27.
  72. Strader AD, Shi H, Ogawa R, Seeley RJ, Reizes O. The effects of the melanocortin agonist (MT-II) on subcutaneous and visceral adipose tissue in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322(3):1153-61.

73. Bluher S, Ziotopoulou M, Bullen JW, Jr., et al. Responsiveness to peripherally administered melanocortins in lean and obese mice. *Diabetes* 2004;53(1):82-90.
74. Katsuki A, Sumida Y, Murashima S, et al. Elevated plasma levels of alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH) are correlated with insulin resistance in obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24(10):1260-4.
75. Hoggard N, Johnstone AM, Faber P, et al. Plasma concentrations of alpha-MSH, AgRP and leptin in lean and obese men and their relationship to differing states of energy balance perturbation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;61(1):31-9.
76. Donahoo WT, Hernandez TL, Costa JL, et al. Plasma alpha-melanocyte-stimulating hormone: sex differences and correlations with obesity. *Metabolism* 2009;58(1):16-21.
77. Nam SY, Kratzsch J, Kim KW, Kim KR, Lim SK, Marcus C. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of leptin, NPY, and alpha-MSH in obese women and their relationship to negative energy balance. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(10):4849-53.
78. Gavrilu A, Chan JL, Miller LC, Heist K, Yiannakouris N, Mantzoros CS. Circulating melanin-concentrating hormone, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone levels in relation to body composition: alterations in response to food deprivation and recombinant human leptin administration. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(2):1047-54.
79. Hoch M, Eberle AN, Wagner U, Bussmann C, Peters T, Peterli R. Expression and localization of melanocortin-1 receptor in human adipose tissues of severely obese patients. *Obesity (Silver Spring)* 2007;15(1):40-9.
80. Chhajlani V. Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. *Biochem Mol Biol Int* 1996;38(1):73-80.
81. Smith SR, Gawronska-Kozak B, Janderova L, et al. Agouti expression in human adipose tissue: functional consequences and increased expression in type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52(12):2914-22.
82. Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Rayner DV. Regulation of adipose tissue leptin secretion by alpha-melanocyte-stimulating hormone and agouti-related protein: further evidence of an interaction between leptin and the melanocortin signalling system. *J Mol Endocrinol* 2004;32(1):145-53.
83. Cho KJ, Shim JH, Cho MC, et al. Signaling pathways implicated in alpha-melanocyte stimulating hormone-induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biochem* 2005;96(4):869-78.
84. Rodrigues AR, Pignatelli D, Almeida H, Gouveia AM. Melanocortin 5 receptor activates ERK1/2 through a PI3K-regulated signaling mechanism. *Mol Cell Endocrinol* 2009;303(1-2):74-81.
85. Safarinejad MR, Hosseini SY. Salvage of sildenafil failures with bremelanotide: a randomized, double-blind, placebo controlled study. *J Urol* 2008;179(3):1066-71.
86. Lansdell MI, Hepworth D, Calabrese A, et al. Discovery of a selective small-molecule melanocortin-4 receptor agonist with efficacy in a pilot study of sexual dysfunction in humans. *J Med Chem* 2010;53(8):3183-97.
87. Safarinejad MR. Evaluation of the safety and efficacy of bremelanotide, a melanocortin receptor agonist, in female subjects with arousal disorder: a double-blind placebo-controlled, fixed dose, randomized study. *J Sex Med* 2008;5(4):887-97.
88. Krishna R, Gumbiner B, Stevens C, et al. Potent and selective agonism of the melanocortin receptor 4 with MK-0493 does not induce weight loss in obese human subjects: energy intake predicts lack of weight loss efficacy. *Clin Pharmacol Ther* 2009;86(6):659-66.
89. Catania A, Gatti S, Colombo G, Lipton JM. Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol Rev* 2004;56(1):1-29.
90. Coll AP. Effects of pro-opiomelanocortin (POMC) on food intake and body weight: mechanisms and therapeutic potential? *Clin Sci (Lond)* 2007;113(4):171-82.
91. Lee M, Wardlaw SL. The central melanocortin system and the regulation of energy balance. *Front Biosci* 2007;12:3994-4010.

# *Insulin Action in Peripheral Glucose Uptake - The Molecular Perspective*

## Acção Periférica da Insulina na Captação de Glucose – a Perspectiva Molecular

Ricardo A. Afonso, PhD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CEDOC, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina, Universidade do Algarve

Correspondência: Ricardo A. Afonso › Área de Ensino e Investigação em Ciências Funcionais e Alvos Terapêuticos (Departamento de Fisiologia) › Faculdade de Ciências Médicas › Universidade Nova de Lisboa › Campo Mártires da Pátria, 130, 1169-056 LISBOA › ricardo.afonso@fcm.unl.pt

### RESUMO

Nos últimos anos, a insulinoresistência tem sido objecto de inúmeros estudos e um dos principais alvos da pesquisa e intervenção farmacológicas. Como consequência, importantes passos têm sido dados a um ritmo acelerado, com vista à compreensão dos mecanismos associados à acção da insulina, bem como às suas alterações. Deste modo, a tomada de conhecimento dos mais recentes avanços nesta área e de como eles se encaixam na panorâmica global da acção da insulina parece ser útil, tanto do ponto de vista da pesquisa como do ponto de vista clínico.

O presente é o primeiro de dois mini-artigos de revisão acerca da acção da insulina no aporte periférico de glucose. Esta primeira revisão tem como objectivo dar uma visão geral dos eventos intracelulares conducentes à captação de glucose insulino-dependente, enquanto que na segunda revisão será efectuada uma abordagem da acção da insulina numa perspectiva fisiológica, *ie*, integrativa, dando particular ênfase às diferenças na acção da insulina de acordo com o estado prandial.

Assim, na presente publicação será dada uma visão sumária e geral das principais vias de transdução de sinal da insulina, envolvidas no aporte de glucose por tecidos periféricos (extra-hepáticos). Apesar de neste artigo não se fazer uma abordagem farmacológica, espera-se que constitua uma boa base para compreender os mecanismos associados à fisiopatologia e farmacologia das alterações na acção da insulina.

### PALAVRAS-CHAVE

Insulina; Acção da insulina; Receptor de insulina; Transdução de sinal da insulina; Aporte de glucose.

### ABSTRACT

*In the recent years, insulin resistance has become the aim of numerous studies and one of the major focuses for pharmacological research and intervention. As a logical consequence, important steps towards the knowledge of insulin action and its alterations have been added at a high rate. Therefore, the awareness about the recent breakthroughs in this field and about how they fit within the whole picture of insulin action seems to be very useful, both in clinical and research practice. The present article is the first of two mini-reviews concerning peripheral insulin action in glucose uptake. This first review article aims at the intracellular events leading to insulin-dependent glu-*



cose uptake, whereas in the second review insulin action will be approached in a whole-body perspective, giving particular emphasis to differences in insulin action according to the prandial state. Thus, in the present review, we will provide a brief overview of the major insulin signaling pathways involved in peripheral (extra-hepatic) glucose uptake. Although this article does not aim pharmacological therapeutic, we hope that it may launch some minimum comprehensive basis to better understand the mechanism behind the pathophysiology and pharmacology of insulin action.

#### KEYWORDS

*Insulin; Insulin action; Insulin receptor; Insulin signalling pathway; Glucose uptake.*

## INTRODUCTION

Insulin is probably the most important anabolic hormone in the human organism<sup>1</sup>. At the cellular level, its action is characterized by several effects, which suggests the involvement of multiple signaling pathways initiated by the binding of insulin to the receptor.

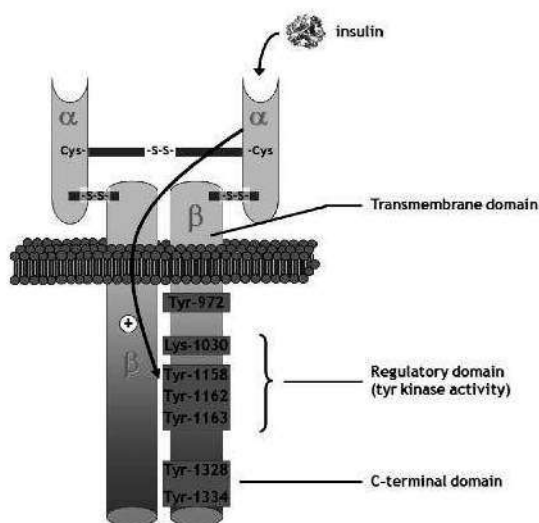
The present review aims to provide a brief overview of the major insulin signaling pathways involved in glucose uptake via GLUT4 translocation, in particular in adipose tissue and skeletal muscle, last of which is responsible for about 75 % of the insulin-dependent glucose uptake<sup>2</sup>. Transposition from the cellular to the physiological level (*ie*, whole-body) will be essayed in a second review, resulting in a broad outline of insulin action on glucose metabolism and on glucose uptake in particular.

### INSULIN RECEPTOR

The insulin receptor is ubiquitous in vertebrate tissues, although it may be expressed in different concentrations in different tissues<sup>3</sup>. A general schematic representation of the insulin receptor is provided in figure 1.

Structurally, insulin receptor is an heterotetrameric glycoprotein, composed of two  $\alpha$ -subunits and by two  $\beta$ -subunits, with N-terminal complex carbohydrates capped by terminal sialic acid residues<sup>4,5</sup>. Insulin receptor structure is stabilized by 3 disulphide

FIGURE 1



Schematic representation of the insulin receptor. The insulin receptor presents two extracellular  $\alpha$ -subunits, which contain the domains of insulin binding, and two  $\beta$ -subunits, where occurs binding of ATP and tyrosine phosphorylation (regulatory domain – intracellular portion of  $\beta$ -subunits). Cys, cysteine residue; -S-S-, disulphide bond; Tyr, tyrosine residue; Lys, lysine residue. ⊕, activation.

bonds that link the two  $\alpha$ -subunits to each other and to the  $\beta$ -subunits, presenting a  $(\alpha\beta)_2$  organization<sup>6,7</sup>. The  $\alpha$ -subunits are entirely located in the outside the cell, whereas  $\beta$ -subunits contain one extracellular portion, one transmembrane region and an intracellular region, last of which includes a juxtamembrane domain, a regulatory domain (activation domain) and a C-terminal domain<sup>6,8</sup>, with different functional roles.

Presently, there are two types of insulin receptor described: types A and B. The difference between these two isoforms is the presence of a 12 aminoacid sequence between

positions 716 and 717 of the  $\alpha$ -subunits of type A insulin receptor<sup>9</sup> Type B insulin receptor is highly specific for insulin and prominent in the major target-tissues for insulin action, such as liver, skeletal muscle and adipose tissue<sup>10</sup>. Type A insulin receptor promotes binding of IGF-2 (insulin-like growth factor 2) instead of insulin and is present in many fetal tissues, central nervous system and haematopoietic cells<sup>10</sup>. Patients with accumulation of type A receptor in skeletal muscle seem to be more prompt to the development of insulin resistance<sup>11</sup>.

### INSULIN BINDING AND ACTIVATION OF THE RECEPTOR

Insulin binds to one of the  $\alpha$ -subunits of the insulin receptor, bringing the two  $\alpha$ -subunits closer upon disruption of the  $\alpha_2$ -dimer<sup>6,7</sup>. Although there are two major binding sites (in the two  $\alpha$ -subunits – figure 1), only one insulin molecule binds to the insulin receptor with high affinity, presenting a negative cooperativity for insulin concentrations lower than 0.1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ <sup>12</sup>.

Insulin binding to the  $\alpha$ -subunit induces tyrosine kinase activity in the regulatory domain of the intracellular portion of the  $\beta$ -subunit, promoting phosphorylation of tyrosine residues of this domain and concomitant activation of the insulin receptor - autophosphorylation.

Autophosphorylation of the insulin receptor is the key step in the initiation of the intracellular signalling and it may occur at seven different tyrosine residues, located in the three regions of the  $\beta$ -subunits with tyrosine kinase activity (juxtamembrane, regulatory or activation and C-terminal)<sup>3</sup>. However, the process seems to be initiated by phosphorylation of the tyrosine<sup>1162</sup> residue of the regulatory domain<sup>6</sup> (figure 1).

Insulin binding induces conformational changes in the regulatory (or activation) domain that allow binding to ATP, favoring the initial phosphorylation of the tyro-

sine<sup>1162</sup> residue (regulatory domain) and, subsequently, the remaining tyrosine residues of the regulatory domain of the insulin receptor<sup>6</sup>. Phosphorylation of tyrosine residues in the insulin receptor allow the recruitment, docking and activation of the effector proteins involved in the signalling cascade that present SH2 (Src-2 homology) domains<sup>2,13,14</sup>. Many of these effector proteins are small adaptive molecules, such as p85, which is the regulatory subunit of the enzyme phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) and of CrkII, a small protein G activation molecule<sup>2</sup>.

After insulin binding and activation of the insulin receptor, the complex insulin-insulin receptor is internalized and incorporated into endosomes, still in an active form, which facilitates the binding of the cytoplasmatic substrates<sup>15</sup>.

Interestingly, in the absence of insulin,  $\alpha$ -subunits seem to exert a negative effect upon the regulatory domains, thus blocking the signal transduction cascade<sup>2,3,6,16,17</sup>.

This unusual form of activation seems to allow small molecules to interact with the insulin receptor in distinct sites from the activation domains of insulin<sup>18</sup>.

### INSULIN SIGNALING PATHWAYS INVOLVED IN GLUCOSE UPTAKE

Both insulin receptor and the majority of the proteins involved in insulin signalling are activated by tyrosine residues phosphorylation<sup>13</sup>.

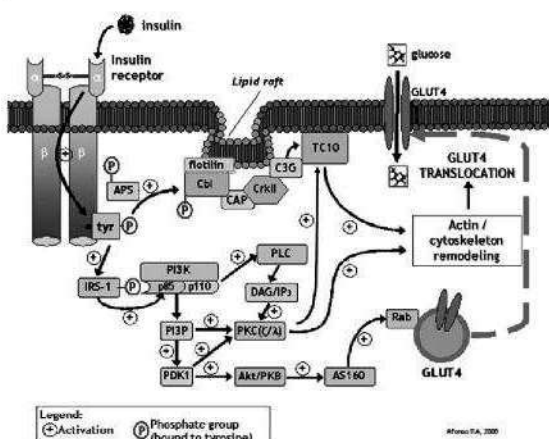
There are several intracellular substrates of the insulin receptor that can be phosphorylated at tyrosine residues by the receptor itself: Gab1, p60<sup>dok</sup>, APS, Shc isoforms, Cbl and the proteins of the IRS family (insulin receptor substrate). Many of these proteins are common substrates of the insulin receptor and of the IGF-1 receptor; however, the different specificity of both recruitment and phosphorylation ensure an adequate regulation of the signalling cascades of insulin

and IGF-1 receptors<sup>19</sup>.

Additionally, APS, Cbl and IRS proteins, in particular, have been associated with the process of glucose uptake through stimulation of glucose transporters-4 (GLUT4) translocation<sup>2</sup>.

Figure 2 summarizes the major insulin signaling pathways that involve these substrates, leading to GLUT4 translocation and glucose uptake.

FIGURE 2



Major insulin signaling pathways for glucose uptake acting through glucose transporters-4 (GLUT4). Insulin receptor substrate-1 (IRS1) was used, since it is the most common protein in the IRS family. Tyr, tyrosine; PI3K, 3-phosphatidylinositol kinase; PI3P, 3-phosphatidylinositol phosphate; PDK1, phosphoinositide-dependent kinase; Akt/PKB, protein B kinase; PKCζ/λ, atypical protein C kinases; AS160, Akt Substrate of 160 kDa; PLC, phospholipase C; DAG, diacylglycerol; IP<sub>3</sub>, 1,4,5-inositol triphosphate; APS, adaptative protein with PH and SH2 domains; Cbl, protooncogene Casitas b-lineage lymphoma (c-Cbl); CAP, Cbl-associated protein.

The most relevant mediators of insulin action in glucose uptake by skeletal muscle and adipocytes are the IRS proteins, in particular IRS-1 and IRS-2. In mammals, four major proteins of the IRS family were described: IRS-1, expressed in skeletal muscle and adipose tissue; IRS-2, present in the brain, ovary, liver and adipose tissue; IRS-3, expressed in adipose tissue, presumably in rodents only; and IRS-4, present in the thymus and kidney<sup>13</sup>. IRS proteins present an amine terminal, with binding domains for the insulin receptor and a carboxyl terminal, with tyrosine phosphorylation sites<sup>20</sup>.

Following tyrosine phosphorylation, IRS

protein activates PI3K, which plays a central role in GLUT4 translocation. IRS activates PI3K by binding to p85 regulatory subunit, which presents two SH2 domains that bind to phosphorylated residues in IRS proteins<sup>2</sup>. Besides p85 subunit, PI3K presents a p110 catalytic subunit, responsible for phosphoinositides phosphorylation at position 3, producing phospholipidic compounds of the phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) family, namely phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PtdInsP<sub>3</sub>)<sup>2</sup>.

PI3P (and PtdInsP<sub>3</sub> in particular) activate phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1), which in turn activates protein kinase B (Akt/PKB) and the atypical protein kinase C (PKCζ and PKCλ)<sup>2</sup>. It has also been described that PtdInsP<sub>3</sub> can bind directly to PKC (PKCζ and PKCλ)<sup>13</sup> and to Akt/PKB, activating them<sup>2</sup>, therefore not requiring PDK1 as an intermediate.

Active Akt/PKB then promotes phosphorylation of Akt Substrate of 160 kDa protein (AS160)<sup>21</sup>, which is constitutively associated to GLUT4 vesicles<sup>22</sup> and in particular to Rab proteins, small G proteins involved in the processes of transport and fusion of GLUT4 vesicles to plasma membrane<sup>23</sup>. Thus, AS160 phosphorylation by Akt/PKB promotes activation of the Rab proteins<sup>22,24</sup>, leading to a higher rate of GLUT4 translocation<sup>23</sup> - this topic will be further explored in the next section. On the other hand, PI3K can activate phospholipase C (PLC), resulting in the production of the second messengers DAG and inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>), which activate PKCζ, thus stimulating glucose uptake<sup>22</sup> (figure 2).

An additional insulin signalling pathway contributing to GLUT4 translocation and somehow independent of IRS phosphorylation and PI3K activation is described<sup>1</sup>, and also presented in figure 2.

Such pathway involves phosphorylation of both APS (adaptive protein with SH2 and PH domains, last of which is present in Akt/PKB, allowing this enzyme to bind

PtdInsP<sub>3</sub>) and Cbl protooncogene (Casitas b-lineage lymphoma, c-Cbl)<sup>2,25</sup> directly by the IR<sup>1,2,25</sup>. APS is involved in Cbl recruitment for the insulin receptor<sup>26</sup>. In the majority of insulin-sensitive cells Cbl is associated with the adaptive protein CAP (Cbl-associated protein)<sup>2</sup>. Following phosphorylation, the Cbl-CAP complex is transported into lipid rafts in the plasma membrane, where it binds to flotilin and recruits CrkII protein<sup>2</sup>. CrkII then forms a complex with the guanyl nucleotide exchange protein C3G<sup>27</sup>, which activates TC10<sup>22,28</sup>. TC10 is a GTP-binding protein present in the lipid rafts that contributes to GLUT4 translocation and their docking at the plasma membrane<sup>26,28</sup>, possibly through regulation of actin microfilaments dynamics<sup>22,29,30</sup>.

Although the TC10 pathway can be seen as an separate pathway from the PI3K-dependent one, some studies have suggested that TC10 activates PI3P<sup>31</sup> and others have described that atypical PKC (PKC $\zeta$  and PKC $\lambda$ ) are also able to promote TC10 activation<sup>26,32</sup>. Thus, atypical PKC may represent a point of convergence for the PI3K and TC10 signaling pathways<sup>19</sup>, both of which contributing synergistically to GLUT4 translocation (figure 2).

### GLUT4 TRANSLOCATION

GLUT4, present mostly in skeletal muscle and adipocyte, are located within vesicles that move in a cyclic manner between the intracellular storing sites and plasma membrane. Insulin promotes the presence of GLUT4 at the plasma membrane in two distinct, but synergistic ways: by increasing the rate of GLUT4 exocytosis and by reducing their internalization rate<sup>2,33</sup>.

As in the case of the insulin secretory granules in  $\beta$ -pancreatic cells, GLUT4 vesicles also seem to be translocated towards the plasma membrane by means of a system involving microtubules network and actin polymerization<sup>2,22</sup>. Actin remodeling is

required not only for translocation of the GLUT4 vesicles, but also to their fusion with the plasma membrane<sup>2</sup>.

As stated in the previous section and presented in figure 2, the remodeling or reorganization of the actin filaments in response to insulin binding to the receptor appears to be modulated by both the TC10 and IRS/PI3K pathways, through activation of the Rab proteins<sup>22</sup>.

Rab proteins have been shown to be necessary effectors in vesicle trafficking, docking and fusion. In particular, Rabs 2A, 8A, 10, and 14 are expressed in insulin-sensitive tissues and appear to be substrates of the AS160 GAP domain (IRS/PI3K pathway) and are associated with insulin-responsive GLUT4-containing vesicles<sup>34-36</sup>. AS160 thus may represent a convergence between insulin signaling and vesicle trafficking<sup>22</sup>. AS160 is a negative regulator of basal GLUT4 exocytosis, ie, in basal conditions, AS160 associates with GLUT4 vesicles, maintaining Rab proteins in their inactive form (Rab-GDP)<sup>33,34</sup>. Insulin-stimulated phosphorylation of S160 (PI3K pathway) inhibits AS160 negative effect on Rab proteins, causing a shift towards Rabs activation (Rab-GTP complex formation) and allowing for Rab-dependent GLUT4 translocation to occur<sup>33,34,37</sup>.

As mentioned earlier, TC10 can also stimulate the Rab proteins mechanism through activation of PI3P (figure 2). Additionally, TC10 seems to activate actin-related protein 3 (Arp3), actin-regulatory neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP)<sup>30</sup> and exocyst protein complex<sup>38</sup>, which are involved in the regulation of actin polymerization (N-WASP and Arp3), as well as docking and anchoring of GLUT4 vesicles to the plasma membrane (exocyst protein complex)<sup>22,30,38</sup>. This TC10-mediated process is required for the subsequent fusion of GLUT4 vesicles to the plasma membrane carried out by soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein

receptors (SNARE), namely SNAP-23, syntaxin 4, Synip, Munc18c and vesicle-associated membrane protein-2 (VAMP2) and the plasma membrane proteins synaptosome-associated 25-kDa protein and syntaxin-1A<sup>22,39-41</sup>.

#### INHIBITION OF THE INSULIN SIGNALING CASCADE

Besides tyrosine phosphorylation (figure 2), both insulin receptor and IRS proteins have the potential to be phosphorylated at serine or threonine residues, which blocks or impairs the insulin signaling pathway<sup>42-44</sup>. Such inhibitory effect of serine/threonine phosphorylation is achieved by reducing the number of phosphorylated tyrosine residues<sup>2,43,45</sup>, by dissociating IRS proteins from their receptor, hindering tyrosine residues phosphorylation<sup>46</sup>, by releasing IRS from the intracellular complexes that maintain them in close proximity to the receptor<sup>47</sup>, by promoting IRS degradation<sup>48</sup>, or by inducing IRS interaction with other proteins rather than with the tyrosine kinase catalytic site of PI3K<sup>2,49</sup>.

These inhibitory (serine/threonine) phosphorylations constitute a physiological feedback mechanism in insulin signaling<sup>50</sup> and allow the establishment of cross-talk mechanisms with different pathophysiological pathways that promote insulin resistance<sup>2,43,50</sup>. Indeed, most of the stress and/or inflammation pathways studied so far stimulate serine/threonine phosphorylation of either IRS or insulin receptor (or both) as a way to induce insulin resistance<sup>51</sup>.

Several kinases are known to be involved in the process of serine/threonine phosphorylation-dependent regulation, namely PI3K, Akt/PKB, glycogen synthase kinase-3 (GSK3) and mammalian target of rapamycin (mTOR)<sup>2</sup>, as well as PKC<sup>43</sup> and the inhibitor of nuclear factor  $\kappa$  (I $\kappa$ B) kinase<sup>2</sup>; these last two (PKC and I $\kappa$ B) have been suggested to be involved in the obesi-

ty-induced insulin resistance<sup>2,52,53</sup>.

Insulin action is also attenuated by protein tyrosine phosphatases (PTPases) that promote tyrosine dephosphorylation of the insulin receptor and its substrates<sup>2,54</sup>, a mechanism that seems to be augmented in many insulin resistant conditions<sup>2,55</sup>, particularly in those associated with inflammation<sup>56</sup>. Indeed, in studies using transgenic knockout of PTP1B models was observed an increase in the number of phosphorylated tyrosine residues, in both the receptor and IRS proteins, as well as an amelioration of insulin sensitivity in muscle<sup>2</sup> and liver<sup>57,58</sup>, improving or avoiding the diabetic condition<sup>59</sup>.

#### CONCLUSION

Insulin plays a central role in carbohydrate metabolism. Although insulin presents different effects in different target-organs, one can consider that its major role in extrahepatic tissues, such as skeletal muscle and adipose tissue, is to promote glucose uptake. The knowledge of the molecular aspects of insulin action is important to understand the mechanism underlying pathophysiology and pharmacology of insulin resistance. In the present mini-article, we provided a brief review of the main signaling pathways that ensure insulin-stimulated glucose uptake.

The insulin receptor is an obvious target molecule to pharmacologically potentiate insulin action. However, other molecules can be key players for this purpose. Akt/PKB is also a pivotal molecule for insulin signaling pathways. However, in those tissues that are dependent on insulin to acquire glucose, GLUT4 is the main glucose transporter available. Indeed, most insulin signaling pathways will ultimately lead to GLUT4 expression and/or translocation. Furthermore, even insulin-independent pathways promote glucose uptake via GLUT4 translocation. Therefore, GLUT4 can be considered as an essential key player and

target molecule for the study and/or modulation of different insulin signaling pathways involved in glucose uptake, since GLUT4 compliance should always be ensured in order to allow insulin-dependent glucose uptake.

The molecular aspects summarized herein constitute the basis for a second review, in which insulin action will be approached from a whole-body physiological perspective, more directed to the clinic.

## ACKNOWLEDGEMENTS

A word of acknowledgement to Professors M. Paula Macedo and Helena Cardoso, for the help revising the present manuscript and for recognizing its scientific merit.

## REFERENCES

1. Saltiel AR, Pessin JE (2002) Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol* 12,65-71.
2. Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414,799-806.
3. White MF, Kahn CR (1994) The insulin signaling system. *J Biol Chem* 269,1-4.
4. Edge ASB, Kahn RC, Spiro RG (1990) Insulin Receptor Carbohydrate Units Contain Poly-N-Acetyllactosamine Chains. *Endocrinology* 127,1887-1895.
5. Bjornholm M, Zierath JR (2005) Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes. *Biochem. Soc. Trans.* 33,354-357.
6. White MF (1997) The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40 Suppl 2,S2-17.
7. Ottensmeyer FP, Beniac DR, Luo RZ, et al. (2000) Mechanism of transmembrane signaling: insulin binding and the insulin receptor. *Biochemistry* 39,12103-12.
8. Yip RG, Goodman HM (1999) Growth hormone and dexamethasone stimulate lipolysis and activate adenylyl cyclase in rat adipocytes by selectively shifting Gi alpha2 to lower density membrane fractions. *Endocrinology* 140,1219-27.
9. Lawrence MC, McKern NM, Ward CW (2007) Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. *Current Opinion in Structural Biology Catalysis and regulation / Proteins* 17,699-705.
10. Mosthaf L, Grako K, Dull TJ, et al. (1990) Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *Embo J* 9,2409-13.
11. Savkur RS, Philips AV, Cooper TA (2001) Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 29,40-7.
12. De Meyts P (1994) The structural basis of insulin and insulin-like growth factor-I receptor binding and negative co-operativity, and its relevance to mitogenic versus metabolic signalling. *Diabetologia* 37 Suppl 2,S135-48.
13. White TW, Srinivas M, Ripps H, et al. (2002) Virtual cloning, functional expression, and gating analysis of human connexin31.9. *Am J Physiol Cell Physiol* 283,C960-70.
14. Whitehead JP, Clark SF, Urso B, et al. (2000) Signalling through the insulin receptor. *Curr Opin Cell Biol* 12,222-8.
15. Carpentier JL, Paccaud JP, Backer J, et al. (1993) Two steps of insulin receptor internalization depend on different domains of the beta-subunit. *J Cell Biol* 122,1243-52.
16. Shoelson SE, White MF, Kahn CR (1988) Tryptic activation of the insulin receptor. Proteolytic truncation of the alpha-subunit releases the beta-subunit from inhibitory control. *J Biol Chem* 263,4852-60.
17. Villalba M, Wente SR, Russell DS, et al. (1989) Another version of the human insulin receptor kinase domain: expression, purification, and characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86,7848-52.
18. Zhang B, Salituro G, Szalkowski D, et al. (1999) Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science* 284,974-7.
19. Chang L, Chiang SH, Saltiel AR (2004) Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med* 10,65-71.
20. Liu YF, Herschkovitz A, Boura-Halfon S, et al. (2004) Serine phosphorylation proximal to its

- phosphotyrosine binding domain inhibits insulin receptor substrate 1 function and promotes insulin resistance. *Mol Cell Biol* **24**,9668-81.
21. Kane S, Sano H, Liu SC, *et al.* (2002) A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain. *J Biol Chem* **277**,22115-8.
  22. Brozinick JT, Jr., Berkemeier BA, Elmendorf JS (2007) "Actin" on GLUT4: membrane & cytoskeletal components of insulin action. *Curr Diabetes Rev* **3**,111-22.
  23. Jordens I, Marsman M, Kuijl C, *et al.* (2005) Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic* **6**,1070-7.
  24. Sano H, Kane S, Sano E, *et al.* (2003) Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem* **278**,14599-602.
  25. Ribon V, Saltiel AR (1997) Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* **324** (Pt 3),839-45.
  26. Saito M, Lessard SJ, Rivas DA, *et al.* (2008) Activation of atypical protein kinase C[ $\zeta$ ] toward TC10 is regulated by high-fat diet and aerobic exercise in skeletal muscle. *Metabolism* **57**,1173-1180.
  27. Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, *et al.* (2001) Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* **410**,944-8.
  28. Watson RT, Shigematsu S, Chiang SH, *et al.* (2001) Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulin signaling and GLUT4 translocation. *J Cell Biol* **154**,829-40.
  29. Kanzaki M, Watson RT, Hou JC, *et al.* (2002) Small GTP-binding protein TC10 differentially regulates two distinct populations of filamentous actin in 3T3L1 adipocytes. *Mol Biol Cell* **13**,2334-46.
  30. Jiang ZY, Chawla A, Bose A, *et al.* (2002) A phosphatidylinositol 3-kinase-independent insulin signaling pathway to N-WASP/Arp2/3/F-actin required for GLUT4 glucose transporter recycling. *J Biol Chem* **277**,509-15.
  31. Maffucci T, Brancaccio A, Piccolo E, *et al.* (2003) Insulin induces phosphatidylinositol-3-phosphate formation through TC10 activation. *Embo J* **22**,4178-89.
  32. Kanzaki M, Mora S, Hwang JB, *et al.* (2004) Atypical protein kinase C (PKC[ $\zeta$ ]/[ $\lambda$ ]) is a convergent downstream target of the insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and TC10 signaling pathways. *J Cell Biol* **164**,279-290.
  33. Eguez L, Lee A, Chavez JA, *et al.* (2005) Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein. *Cell Metab* **2**,263-72.
  34. Larance M, Ramm G, Stockli J, *et al.* (2005) Characterization of the role of the Rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking. *J Biol Chem* **280**,37803-13.
  35. Miinea CP, Sano H, Kane S, *et al.* (2005) AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. *Biochem J* **391**,87-93.
  36. Elmendorf JS, Pessin JE (1999) Insulin signaling regulating the trafficking and plasma membrane fusion of GLUT4-containing intracellular vesicles. *Exp Cell Res* **253**,55-62.
  37. Zeigerer A, McBrayer MK, McGraw TE (2004) Insulin stimulation of GLUT4 exocytosis, but not its inhibition of endocytosis, is dependent on RabGAP AS160. *Mol Biol Cell* **15**,4406-15.
  38. Inoue M, Chang L, Hwang J, *et al.* (2003) The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin. *Nature* **422**,629-33.
  39. Rothman JE (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**,55-63.
  40. Sudhof TC (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* **375**,645-53.
  41. Kawanishi M, Tamori Y, Okazawa H, *et al.* (2000) Role of SNAP23 in insulin-induced translocation of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. Mediation of complex formation between syntaxin4 and VAMP2. *J Biol Chem* **275**,8240-7.
  42. Tanti JF, Gremeaux T, Van Obberghen E, *et al.* (1994) Insulin receptor substrate 1 is phosphorylated by the serine kinase activity of phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem J* **304** (Pt 1),17-21.
  43. Waraich RS, Weigert C, Kalbacher H, *et al.* (2008) Phosphorylation of Ser357 of rat insulin receptor substrate-1 mediates adverse effects of protein kinase C- $\delta$  on insulin action in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* **283**,11226-33.
  44. Boura-Halfon S, Zick Y (2009) Phosphorylation

- of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**,E581-591.
45. Tanti JF, Gremeaux T, van Obberghen E, *et al.* (1994) Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. *J Biol Chem* **269**,6051-7.
  46. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, *et al.* (2002) Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* **277**,1531-7.
  47. Tzatsos A, Kandrор KV (2006) Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Mol Cell Biol* **26**,63-76.
  48. Greene MW, Sakaue H, Wang L, *et al.* (2003) Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation. *J Biol Chem* **278**, 8199-211.
  49. Craparo A, Freund R, Gustafson TA (1997) 14-3-3 (epsilon) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate 1 in a phosphoserine-dependent manner. *J Biol Chem* **272**,11663-9.
  50. Boura-Halfon S, Zick Y (2009) Serine kinases of insulin receptor substrate proteins. *Vitam Horm* **80**,313-49.
  51. Tanti JF, Jager J (2009) Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol.*
  52. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, *et al.* (2001) Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* **293**,1673-7.
  53. Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, *et al.* (2001) Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* **108**,437-46.
  54. Venable CL, Frevert EU, Kim YB, *et al.* (2000) Overexpression of protein-tyrosine phosphatase-1B in adipocytes inhibits insulin-stimulated phosphoinositide 3-kinase activity without altering glucose transport or Akt/Protein kinase B activation. *J Biol Chem* **275**,18318-26.
  55. Delibegovic M, Zimmer D, Kauffman C, *et al.* (2009) Liver-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) improves metabolic syndrome and attenuates diet-induced endoplasmic reticulum stress. *Diabetes* **58**,590-9.
  56. Zabolotny JM, Kim YB, Welsh LA, *et al.* (2008) Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J Biol Chem* **283**,14230-41.
  57. Haj FG, Zabolotny JM, Kim YB, *et al.* (2005) Liver-specific protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) re-expression alters glucose homeostasis of PTP1B-/-mice. *J Biol Chem* **280**,15038-46.
  58. Delibegovic M, Bence KK, Mody N, *et al.* (2007) Improved Glucose Homeostasis in Mice with Muscle-Specific Deletion of Protein-Tyrosine Phosphatase 1B, 10.1128/MCB.00959-07. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7727-7734.
  59. Xue B, Kim YB, Lee A, *et al.* (2007) Protein-tyrosine phosphatase 1B deficiency reduces insulin resistance and the diabetic phenotype in mice with polygenic insulin resistance. *J Biol Chem* **282**,23829-40.
  60. Afonso RA (2009) Sensibilidade à Insulina Pós-prandial: Mecanismos Fisiológicos de Ativação e Fisiopatologia na Obesidade. *Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa Tese de Doutoramento.*



# Destaques do XII Congresso Português de Endocrinologia

João Sequeira Duarte

Tróia, 7 a 30 de Janeiro de 2011

Na avaliação que os membros da Direcção fizeram deste congresso de 2011, foi concluído que a opção por este local se revelou uma aposta acertada, apesar das dificuldades colocadas na última hora em matéria de alojamentos. Pensamos ter conseguido manter uma elevada qualidade científica, e as funcionalidades do Centro de Congressos proporcionaram ao elevado número de participantes, óptimas condições para desfrutarem das sessões científicas e da permuta de experiência com os colegas. Apesar da apreensão inicial os resultados financeiros não foram desequilibrados, apesar das dificuldades por que passam alguns patrocinadores.

A Direcção irá inovar um pouco no próximo Congresso para ter em conta algumas limitações dos espaços disponíveis bem como as sugestões e críticas que foram feitas e consideradas pertinentes.

Como vem sendo habitual realizaram-se dois Cursos Práticos destinados especialmente aos colegas em formação. Um sobre Técnicas de Monitorização Contínua da Glicose da responsabilidade da Dr.<sup>a</sup> Luísa Barros e outro sobre Ecografia da Tireoide da responsabilidade do Grupo de Estudos da Tireoide a quem agradecemos o esforço logístico adicional na pessoa da sua responsável a Dr.<sup>a</sup> Maria João Oliveira.

No primeiro dia de trabalhos tivemos a Apresentação dos dados mais recentes do Estudo do Aporte de Iodo em Portugal pelo Prof. Edward Limbert.

A Conferência I sobre «Glycemia, IGF-1 and cancer» coube ao Prof. Jeff Holly que abriu assim o segundo dia de trabalhos, não defraudando as elevadas expectativas de quem conhecia o orador.

No SIMPÓSIO I sobre “Novos fármacos no tratamento dos carcinomas avançados da Tireoide – o “Estado da Arte”, o Prof. Martin Schlumberger prendeu a assistência. A “Experiência do IPO Lisboa “ com estes fármacos foi apresentada pelo Prof. Valeriano Leite.

No SIMPÓSIO II dedicado às “Doenças ósseas metabólicas”, começámos por ouvir uma importante palestra sobre o tema “Tireoide e osso” pelo Prof. Graham William; seguiu-se o tema “Corticóides e osso” apresentado pelo Prof. Davide Carvalho e “Esteróides sexuais e osso” apresentado pelo Prof. Eurico Fonseca.

A Conferência II “Cardiovascular Risk in women with Polycystic Ovary Syndrome: Causes and Consequences” apresentada pelo Prof. Hector Escobar-Morreale foi escutada com muito interesse.

O SIMPÓSIO III dedicado à “Diabetes gestacional”, foi multidisciplinar, com pediatras e obste-

tras e o novo consenso mereceu ampla participação dos presentes e da representante da DGS.

No SIMPÓSIO SATÉLITE "Hot topics on analogue insulin: another point of view" foram apresentados dados de "Farmacoeconomia: Análogos de insulina ou insulinas humanas: que escolher?" Por Marc Evans (Llandough Hospital, Cardiff). "A Segurança dos análogos de insulina: uma visão do oncologista" proferida por C. Belda-Iniesta (Oncologista do Hospital la Paz, Madrid) foi uma apresentação seguida com interesse e a "Segurança molecular dos análogos de insulina: actualizações", foi apresentada com muita vivacidade por Rafa Simó (Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona) que interpelou muito a assembleia e gerou alguma discussão.

O terceiro dia de trabalhos começou com a CONFERÊNCIA III "Perinatal Programming and the metabolic syndrome" pelo Prof. Andreas Plagemann que expôs o tema em que é uma autoridade reconhecida e foi seguida com grande interesse pela assembleia.

No SIMPÓSIO Satélite V "Os dois lados da moeda na terapêutica da Diabetes: a hiperglicemia e a dislipidemia", o tema "A Intervenção precoce na Diabetes tipo 2" foi defendida pela Prof. Caroline Dickens de um modo seguro. O Dr. João Conceição defendeu a "Sitagliptina: um caminho eficaz e seguro na optimização terapêutica da hiperglicemia". O imperativo da "terapêutica combinada na dislipidemia" foi apresentado pela Dr.ª Elizabete Rodrigues, com a vivacidade que lhe reconhecemos.

Graças às condições oferecidas por este centro de congressos foi possível realizar 6 ENCONTROS COM O ESPECIALISTA:

1. "Terapêutica médica da doença de Graves: propiltiuracilo versus metibazol" com a Dra. Luisa Raimundo
2. "Cushing sub-clínico" com a Dr.ª Isabel Paiva
3. "Disruptores endócrinos" com a Dr.ª Joana Queiroz
4. "O que resta para a terapêutica farmacológica da Obesidade em tempo de crise?" com a Dra. Paula Freitas
5. "Importância do Laboratório de Endocrinologia para o Endocrinologista: truques e dicas" com a Dr.ª Deolinda Madureira
6. "Incidentalomas hipofisários" com o Dr. Fernando Baptista

A CONFERÊNCIA IV sobre "Neuropatia Diabética-evolução do diagnóstico e da terapêutica" foi proferida pelo Prof. José Luís Medina e no final a Direcção e os associados da SPEDM não deixaram de manifestar o seu apreço e estima por este ilustre membro da nossa sociedade que tanto contribuiu no passado e certamente também no futuro, para o fortalecimento da mesma.

O Simpósio Conjunto com a Sociedade Espanhola SEEN e a SPEDM dedicado à "Endocrinologia Translacional: da genética à clínica" começou com duas apresentações de elevado nível por colegas espanhóis. "Genetics and Thyroid Diseases: non-toxic sporadic goiter and autoimmune thyroiditis" foi o tema apresentado pelo Dr. Jose Manuel Miralles, seguido pelo tema "Genetics of monogenic diabetes" apresentado pelo Dr. Luis Castaño. A representação nacional coube ao Prof. Manuel Lemos com "Genética das Insuficiências hipofisárias" e "Genetics of familiar hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia" onde

a Prof.<sup>a</sup> Mafalda Bourbon apresentou também os resultados encontrados na população portuguesa.

O sábado terminou com uma Conferência satélite pelo Dr. Javier Ampudia Blasco intitulada “Benefícios da glulisina em regimes de tratamento intensivo”.

O Domingo começou com a CONFERÊNCIA V proferida pelo Prof. Gregory Kaltzas sobre “Evolving classification systems on neuroendocrine tumours: implications on clinical practice”. Um tema e um orador sugeridos pelo GETNE que se revelou mobilizador.

Houve depois oportunidade de fazer a VISITA AOS CARTAZES, e para a Cerimónia de Encerramento e entrega de prémios, a seguir discriminados:

## PRÉMIOS ATRIBUIDOS NO XII CONGRESSO DE ENDOCRINOLOGIA

### PRÉMIO INVESTIGAÇÃO CLÍNICA

- › **Deprivação Paterna Precoce e Risco de Adenomas Hipofisários**  
*Sobrinho LG, Duarte JS, Paiva I, Gomes L pelo GETH, e Vera Vicente e Pedro Aguiar pela EUROTRIALS.*

e 1 Menção Honrosa

- › **A Actividade da Paraoxonase 1 como Marcador de Risco Cardiometabólico na Diabetes Tipo 2 – Influência da prática moderada de Exercício Físico e de Hábitos Tabágicos**  
*Filipa Mascarenhas Melo, E Teixeira de Lemos, D Marado, F Palavra, J Oliveira, P Garrido, J Sereno, S Baptista, G Gonçalves, A Coelho, F Teixeira, F Reis*

### PRÉMIO INVESTIGAÇÃO BÁSICA ex-aequo

- › **Um novo mecanismo molecular para a regulação do transportador de glicose GLUT1**  
*Ana Isabel Mendes, Paulo Matos, Sónia Moniz and Peter Jordan*
- e
- › **Inibição da DPP-4 com baixas doses de Sitagliptina: efeitos no controlo da glicemia e das lesões pancreáticas num modelo animal de Diabetes Tipo 2**  
*Edite Teixeira de Lemos, C Mega, H Vala, R Fernandes, J Oliveira, F Mascarenhas-Melo, R Pinto, F Teixeira, F Reis*

e 2 Menções honrosas

- › **Expressão de micrornas como marcadores de invasão nos gonadotrofinomas: resultados preliminares**  
*Filipe Da Mota, Paula Soares, Ricardo Celestino, Rune Matthiessen, João Vinagre, Joana Torres, Dário Ligeiro, Patrícia Pereira, Daniela Seixas, Sérgio Castro, Josué Pereira, Elsa Fonseca, Davide Carvalho*

e

- › **Conhecer melhor o coração diabético: vias de sobrevivência e de morte na resposta à isquémia**

*Crisóstomo J; Matafome P; Santos-Silva D.; Rodrigues L.; Sena C.; Gonçalves L.; Pereira P.; Seiça R.*

## PRÉMIO CASUÍSTICA

- › **Níveis de 25OHD numa amostra de doentes com Hiperparatiroidismo Primário**  
*Helder Simões, Paula Font, Deolinda Madureira, Valeriano Leite*

e 2 Menções Honrosas

- › **Paragangliomas, caracterização clínica e funcional de 40 casos**  
*Rita Santos, Rita Domingues, Pedro Montalvão, Miguel Magalhães, Maria João Bugalho*
- › **Carcinomas papilares descobertos de forma incidental após tiroidectomia total por patologia benigna**  
*Teixeira S, Silva AM, Amaral C, Freitas C, Carvalho A, Teixeira MJ, Canha A, Moreira da Costa A, Borges F*

## PRÉMIO NACIONAL DE ENDOCRINOLOGIA – SPEDM/NOVARTIS ONCOLOGY (15.000€)

- › **The lipoprotein receptor LRP1B suppresses growth, angiogenesis and metastatic potential of tumors generated in vivo by modulating the extracellular microenvironment composition**

*Hugo Prazeres, Marta Pinto, Joana Couto, Fernando Rodrigues, João Vinagre, Joana Torres, Vitor Trovisco, Teresa Martins, Manuel Sobrinho-Simões e Paula Soares*

## BOLSA DA SPEDM PARA PROJECTOS DE INVESTIGAÇÃO

- › **Evaluation of CDKN3, ESRP1 and ESRP2 Genes as potential new targets for the treatment of anaplastic thyroid carcinomas**

*Branca Cavaco, Rita Santos, Jaime Pita e Joana Silva*

**PARABÉNS AOS PREMIADOS!!!!**

**AGENDA 2011 / 2012 – CONGRESSOS – REUNIÕES CIENTÍFICAS**

DESIGNAÇÃO   EVENTO	LOCAL	DATA	CONTACTOS   INFORMAÇÕES
<b>INTERNACIONAIS</b>			
Endocrine Society Clinical Endocrinology Update 2011	Nashville, TN USA	08 a 10 Set. 2011	societyservices@endo-society.org
35 <sup>th</sup> Annual Meeting of the European Thyroid Association	Kraków Poland	10 a 14 Set. 2011	info@eta2011.com
35 <sup>th</sup> Meeting of the European Thyroid Association	Kraków Poland	10 a 14 Set. 2011	www.eurothyroid.com
47 <sup>th</sup> European Association for the Study of Diabetes Annual Meeting	Lisbon Portugal	12 a 16 Set. 2011	secretariat@easd.org
11 <sup>th</sup> ESE Postgraduate Course in Clinical Endocrinology	TBC Serbia	22 a 24 Set. 2011	info@euro-endo.org
Childhood and adolescent obesity: a whole-system, strategic approach	London UK	23 Set. 2011	info@medineo.org
50 <sup>th</sup> European Society for Paediatric Endocrinology Meeting	Glasgow UK	25 a 28 Set. 2011	espe2011@congreg.com
Obesity 2011	Orlando, FL USA	1 a 5 Out. 2011	lmaza@obesity.org
81 <sup>st</sup> Annual Meeting of the American Thyroid Association	Indian Wells, California, USA	26 a 30 Out. 2011	www.thyroid.org
European Society of Endocrinology Clinical Update	Limassol Cyprus	26 a 30 Out. 2011	info@euro-endo.org
<b>NACIONAIS</b>			
2º Congresso da Associação Luso-Galaica de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo	Viana do Castelo Portugal	13 a 14 Jan. 2012	www.acropole-servicos.pt
XVI Jornadas de Endocrinologia e Diabetologia, XI Simpósio de Endocrinologia e Diabetes na Gravidez, 3º Curso Prático de Insulinoterapia Intensiva na Diabetes Tipo 1, 2º Curso Prático de Insulinoterapia na Diabetes Tipo 2 e V Curso Prático de Diabetes para Enfermeiros	Hotel Vila Galé Coimbra Portugal	15 a 18 Nov. 2011	endocdiab@huc.min-saude.pt
XII Congresso de Endocrinologia e nutrição dos Açores, XIII Jornadas de Diabetologia e IV Simpósio Satélite	Açores Portugal	25 a 28 Out. 2011	congressos@grupowop.com

## NORMAS DE PUBLICAÇÃO PARA AUTORES

A *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo* aceita para publicação artigos de investigação fundamental, epidemiológica, clínica, sobre administração de serviços de saúde ou sobre educação, bem como artigos de revisão, artigos sobre a prática clínica, relatos de casos clínicos, artigos de opinião e outros que possam contribuir para o desenvolvimento da especialidade de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo ou para a melhoria dos cuidados de saúde prestados aos doentes. Os artigos deverão ser redigidos em português ou inglês, podendo em casos excepcionais ser aceites textos em francês ou castelhano.

Os artigos propostos não podem ter sido objecto de qualquer outro tipo de publicação, nem ter sido simultaneamente propostos para publicação noutras revistas ou jornais. As opiniões expandidas são da inteira responsabilidade dos autores. Os artigos publicados ficarão de inteira propriedade da Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo e não poderão ser reproduzidos, no todo ou em parte, sem prévia autorização do seu Director.

A *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo* subsegue os requisitos constantes das normas de Vancouver(1). Recomenda-se aos autores a sua leitura atenta.

A revista publica artigos nas seguintes secções:

### 1. EDITORIAIS.

Da iniciativa do Editor

### 2. ESTUDOS ORIGINAIS.

Artigos de investigação no âmbito da **endocrinologia, diabetes e metabolismo**. Não deverão ultrapassar as 12.000 palavras, em texto dactilografado a dois espaços, sendo admitido o número máximo de 10 ilustrações (quadros, figuras ou fotografias). Deverão seguir as normas internacionalmente aceites para este tipo de artigos (1). O corpo do artigo deve ser subdividido em: **Introdução, Métodos, Resultados, Discussão**. O artigo deve incluir **Referências Bibliográficas** e, eventualmente, **Agradecimentos**. Deve também incluir um **Resumo/Abstract** (em Português e em Inglês) e duas a seis **Palavras-chave/Keywords**. O uso de abreviaturas e símbolos, bem como as unidades de medida, devem estar de acordo com as normas internacionalmente aceites (2).

A **Introdução** deverá ser sintética. Deve apresentar claramente o problema em questão, resumir o estado actual do conhecimento sobre ele e referir os motivos que levaram à execução do estudo. Os objectivos e/ou hipóteses formuladas devem ser indicados.

Os **Métodos** deverão referir a configuração, local e tempo de duração de estudo, a população estudada, os métodos de amostragem, as unidades de observação e as variáveis medidas, os métodos de recolha de dados, bem como critérios, instrumentos, métodos, aparelhos e técnicas utilizados. A metodologia estatística usada deve ser indicada. No caso particular de estudos de avaliação de qualidade, devem ser indicados a dimensão estudada, o tipo de cuidados, a unidade de estudo e a população estudada, relação temporal, o tipo de dados, o avaliador e os critérios e padrão de qualidade aceites.

Os **Resultados** deverão ser apresentados de forma clara usando textos e ilustrações (figuras ou quadros), apresentar as figuras com algarismos árabes e os quadros com numeração romana, pela ordem da sua primeira citação no texto. O texto não deve repetir dados incluídos em ilustrações, limitando-se nesse caso a realçar ou resumir os seus aspectos mais importantes.

A **Discussão** deverá salientar aspectos novos ou importantes do estudo e apresentar apenas as conclusões justificadas pelos resultados. Poderão ser comentadas limitações ou vieses importantes do estudo. Sempre que possível deverão ser feitas comparações com estudos idênticos realizados por outros autores. Podem ser sugeridas novas hipóteses de trabalho. Não devem ser feitas afirmações não baseadas no estudo efectuado, nem alusões a trabalhos incompletos ou não publicados.

As **Referências Bibliográficas** devem seguir rigorosamente o formato indicado nas normas internacionais (estilo de Vancouver)(1). Devem ser assinaladas no texto com algarismos árabes em elevado, pela ordem

de primeira citação e incluídas neste capítulo, utilizando exactamente a mesma ordem de citação no texto. Os nomes das revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus. A Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo é referenciada usando a abreviatura Rev Port End Diab Metab.

Os **Agradecimentos**, quando existirem, devem ser colocados após as referências Bibliográficas e respeitar rigorosamente as normas internacionais e aceites (1). O **Resumo** deve expor os objectivos do trabalho, a metodologia básica, os resultados e conclusões principais e realçar aspectos novos e importantes do estudo ou das observações. É obrigatoriamente estruturado, incluindo os seguintes subtítulos: *Objectivos, Tipo de estudo, Local, População, Métodos, Resultados e Conclusões*. Não deve ultrapassar as 300 palavras e deve incluir 2 a 6 **Palavras-chave**.

### 3. ARTIGOS BREVES

Textos de pequena dimensão (como, por exemplo, estudos originais curtos ou de divulgação de resultados preliminares, apontamentos sobre casos clínicos, pequenos estudos de séries). Não deverão ultrapassar as 5.000 palavras, em texto dactilografado a dois espaços, sendo admitido o número máximo de 2 ilustrações (quadros, figuras ou fotografias) por artigo.

Devem incluir um **Resumo estruturado** (em Português e em Inglês) semelhante ao descrito para os Estudos Originais e 2 a 6 **Palavras-chave** (em Português e em Inglês).

### 4. REVISÕES

Estudo de revisão bibliográfica ou trabalhos de síntese ou actualização clínicas, que possam constituir instrumentos auxiliares de actualização e de aperfeiçoamento da prática clínica.

Os estudos de revisão não deverão ultrapassar as 12.000 palavras, em texto dactilografado a 2 espaços, sendo admitido o número máximo de 12 ilustrações (quadros, figuras ou fotografias) por artigo. Os artigos devem ser subdivididos em: **Introdução, Métodos, o Corpo da revisão** propriamente dito, **Conclusões, Referências Bibliográficas** e, eventualmente, **Agradecimentos**.

Devem também incluir um **Resumo** (em Português e em Inglês) e 2 a 6 **Palavras-chave** (em Português e em Inglês).

A **Introdução** deverá ser sintética. Deve apresentar claramente o problema em questão, referir os motivos que levaram à execução do estudo e discutir a sua oportunidade.

A pergunta e o objectivo específico da revisão deverão aparecer claramente formulados.

Os **Métodos** deverão referir, fundamentando, a metodologia usada para efectuar o processo de revisão. Devem nomeadamente ser indicados o tópico em revisão, as várias definições (por exemplo, critérios de diagnóstico), processos utilizados para a pesquisa bibliográfica (período a que diz respeito a revisão, bases de dados ou documentais consultadas, descritores utilizados para a pesquisa) e processos e critérios usados para a selecção de fontes documentais (inclusão de toda a bibliografia relevante, exclusão de artigos de má qualidade).

O **Corpo da revisão** deve ser constituído por uma apresentação do conteúdo da revisão propriamente dito, feito de forma estruturada e sistematizada e com recurso a subtítulos, se necessário. Deve incluir elementos de argumentação crítica (avaliação de qualidade dos dados, síntese de dados, perspectivas em confronto, identificação de problemas não resolvidos).

As **Conclusões** devem fornecer um resumo crítico dos dados relevantes, enfatizar os aspectos práticos, equacionar os problemas que subsistem e propor perspectivas futuras.

As **Referências Bibliográficas** devem seguir rigorosamente o formato indicado nas normas internacionais (estilo de Vancouver) (1). Devem ser assinaladas no texto com algarismos árabes em elevado, pela ordem de primeira citação e incluídas neste capítulo, utilizando exactamente a mesma ordem de citação no texto. Os

nomes das revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus. A Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo é referenciada usando a abreviatura Rev Port End Diab Metab.

Os **Agradecimentos**, quando existirem, devem ser colocados após as Referências Bibliográficas e respeitar rigorosamente as normas internacionalmente aceites (1).

O **Resumo** (em Português e em Inglês) deve expor os objectivos do trabalho, a metodologia básica, os resultados e conclusões principais, e realçar aspectos novos e importantes da revisão. É obrigatoriamente estruturado, incluindo os seguintes subtítulos: *Objectivos, Métodos e Conclusões*. Não deve ultrapassar as 300 palavras e deve incluir 2 a 6 **Palavras-chave** (em Português e em Inglês).

### 5. PRÁTICA CLÍNICA

Trabalhos descritivos de experiências ou projectos considerados relevantes para a prática clínica diária. Não deverão ultrapassar as 8.000 palavras, em texto dactilografado a 2 espaços, sendo admitido o número máximo de 4 ilustrações (quadros, figuras ou fotografias) por artigo. Devem incluir um **Resumo** (em Português e em Inglês) que não deve ultrapassar as 300 palavras e 2 a 6 **Palavras-chave** (em Português e em Inglês).

### 6. FORMAÇÃO

Relatos de projectos ou experiências considerados importantes no campo da educação médica pré e pós-graduada no contexto dos cuidados de saúde na área de endocrinologia, diabetes e metabolismo. Não deverão ultrapassar as 6.000 palavras, em texto dactilografado a 2 espaços, sendo admitido o número máximo de 6 ilustrações (quadros, figuras ou fotografias) por artigo. Devem incluir um **Resumo** (em Português e em Inglês) que não deve ultrapassar as 300 palavras e 2 a 6 **Palavras-chave** (em Português e em Inglês).

### 7. RELATOS DE CASOS CLÍNICOS

Textos descritivos de casos clínicos. Não deverão ultrapassar as 6.000 palavras, em texto dactilografado a 2 espaços, sendo admitido o número máximo de 8 ilustrações (quadros, figuras ou fotografias) por artigo. Os artigos devem ser subdivididos em: **Introdução, Descrição do caso, Comentário, Referências Bibliográficas** e, eventualmente, **Agradecimentos**. Devem também incluir um **Resumo** (em Português e em Inglês) e 2 a 6 **Palavras-chave** (em Português e em Inglês).

A **Introdução** deve ser sintética, apresentando o problema em questão e referindo os motivos que levaram à apresentação do caso clínico.

A **Descrição do caso** deve ser constituída por uma apresentação do caso clínico propriamente dito, feito de forma estruturada e com recurso a subtítulos, se necessário.

O **Comentário** deverá chamar a atenção para os aspectos práticos relevantes e incluir uma breve revisão teórica final.

As **Referências Bibliográficas** devem seguir rigorosamente o formato indicado nas normas internacionais (estilo de Vancouver) (1). Devem ser assinaladas no texto com algarismos árabes em elevado, pela ordem de primeira citação e incluídas neste capítulo utilizando exactamente a mesma ordem de citação no texto. Os nomes das revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus. A Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo é referenciada usando a abreviatura Rev Port End Diab Metab.

Os **Agradecimentos**, quando existirem, devem ser colocados após as Referências Bibliográficas e respeitar rigorosamente as normas internacionalmente aceites (1).

O **Resumo** (em Português e em Inglês) não deve ultrapassar as 300 palavras e deve incluir 2 a 6 **Palavras-chave** (em Português e em Inglês).

### 8. OPINIÃO E DEBATE

Textos de opinião livre susceptíveis de fomentar a reflexão e a discussão sobre temas de interesse para a prática clínica em cuidados de saúde primários. Não deverão ultrapassar as 4.000 palavras, em texto dactilografado a 2 espaços. Devem incluir um **Resumo** (em Português e em Inglês) que não deve ultrapassar as 300 palavras e 2 a 6 **Palavras-chave** (em Português e em Inglês).

## NORMAS DE PUBLICAÇÃO PARA AUTORES

### 9. DOCUMENTOS

Declarações, recomendações ou outros documentos de âmbito nacional ou internacional que sejam relevantes para a endocrinologia, diabetes e metabolismo.

### 10. CARTAS AO DIRECTOR

Comentários a artigos publicados previamente na revista ou notas breves sobre experiências relevantes na prática diária. Não deverão ultrapassar as 3.500 palavras, em texto dactilografado a 2 espaços, sendo admitido o número máximo de 1 ilustração (quadro, figura ou fotografia).

### OUTRAS SECÇÕES

Leituras, Agenda, etc..

### PREPARAÇÃO DOS ARTIGOS

Os artigos devem ser dactilografados a 2 espaços em qualquer processador de texto e gravados em formato texto (ASCII). O formato das páginas deve ser A4 (210 x 297mm) e as suas margens de, pelo menos, 25 mm de ambos os lados. As páginas devem ser numeradas.

### PRIMEIRA PÁGINA

Deverá incluir apenas:

1. O título do artigo, que deverá ser conciso.
2. O nome do autor ou autores (devem usar-se apenas 2 nomes ou 3 nomes por autor).
3. O grau, título ou títulos profissionais e/ou académicos do autor ou autores.
4. O serviço, departamento ou instituição onde trabalha(m).

### SEGUNDA PÁGINA

Deverá incluir apenas:

1. O nome, telefone/fax e endereço do autor responsável pela correspondência com a revista acerca do manuscrito.
2. O nome e endereço do autor a quem deve ser dirigida a correspondência sobre o artigo após a sua publicação na revista.

### TERCEIRA PÁGINA

Deverá incluir apenas:

1. Título do artigo.
2. Um resumo (em Português e em Inglês) que não deve ultrapassar as 300 palavras. O resumo deve respeitar as normas indicadas para o tipo de artigo em questão e tornar possível a compreensão do artigo sem que haja necessidade de o ler.
3. De 2 até 6 palavras-chave (em Português e em Inglês) ou curtas frases usando de preferência termos da lista de descritores médicos (MeSH) do Index Medicus, da lista de palavras-chave do FAMILI (2), dos descritores em ciências da saúde (DeCS) da BIREME (3) ou dos descritores da Base Nacional de Dados Bibliográficos PORBASE (Índice de Assuntos).

### PÁGINAS SEGUINTE

As páginas seguintes incluirão o texto do artigo, devendo cada uma das secções em que este se subdivida começar no início de uma página.

### Primeira página a seguir ao texto

Deverá conter o início do capítulo Referências Bibliográficas.

### Primeira página a seguir a Referências Bibliográficas

Deverá incluir o capítulo Agradecimentos, quando este exista.

### PÁGINAS SEGUINTE

Deverão incluir as ilustrações. Estas devem ser enviadas cada uma em sua folha com indicação do respectivo número (algarismo árabe ou numeração romana). Os quadros, com numeração romana, deverão sempre incluir um título curto e ser dactilografados a 2 espaços, sem recurso a linhas de separação horizontais ou verticais no seu interior (excepção feita a linhas de separação de títulos, subtítulos e notas de rodapé). Poderão incluir em rodapé notas explicativas consideradas necessárias e assinaladas utilizando os símbolos indicados nas normas de Vancouver (1).

Gráficos, diagramas e gravuras (**figuras**) deverão ser apresentados com qualidade que permita a sua reprodução directa e numerados com algarismos árabes. As fotografias em suporte de papel ou filme (diapositivos) deverão ter boa qualidade e ser devidamente identificadas (algarismos árabes) com etiqueta autocolante no verso ou na margem. No caso de se tratar de fotografias de pessoas ou de fotografias já publicadas, proceder

de acordo com as normas de Vancouver (1). Fotografias e diapositivos deverão ser enviados em separado.

### ÚLTIMA PÁGINA

Deverá incluir apenas as legendas para as ilustrações, dactilografadas a 2 espaços e identificadas com o algarismo árabe ou o número romano correspondentes à numeração da ilustração.

### Envio dos Artigos

Utilizar e preencher a lista de verificação anexa antes do envio dos artigos.

Devem ser enviados por **correio postal** para: Director da Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Ou por **correio electrónico** para:

1. O original do artigo incluindo ilustrações, gravado em disquete de computador ou em ficheiro(s) anexo(s) a mensagem de correio electrónico.
2. Carta assinada por todos os autores com pedido de publicação, indicando em que secção da revista se propõe a publicação.
3. Declaração, assinada por todos os autores, de acordo com o modelo anexo.
4. Cópias de quaisquer autorizações para reproduzir material já publicado, para utilizar figuras ou relatar informação pessoal sensível de pessoas identificáveis ou para citar os nomes de pessoas a quem se agradecem os contributos.
5. Lista de verificação anexa, devidamente preenchida.

### TRATAMENTO EDITORIAL

Os textos recebidos são identificados por um número comunicado aos autores, que devem referi-lo em toda a correspondência com a revista. São em seguida apreciados por elementos do Conselho Editorial e do Conselho Científico e por um grupo de Revisores, sem que estes tenham conhecimento da identidade dos autores. Os artigos poderão ser aceites sem modificação, recusados ou aceites apenas após correcções ou modificações propostas aos autores e por estes efectuadas. Neste caso, as modificações sugeridas de-verão ser realizadas pelos autores no prazo indicado. O teor das apreciações será sempre comunicado aos autores. Alterações ao manuscrito original poderão ser efectuadas com o acordo dos autores.

Independentemente da decisão sobre a publicação do artigo, apenas serão devolvidos, a pedido dos autores, fotografias ou diapositivos, pelo que se aconselha aos autores a conservação de uma cópia do ficheiro ou disquete enviados.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Comissão Internacional de Editores de Revistas Médicas. Normas para apresentação de artigos propostos para publicação em revistas médicas. Rev Port Clin Geral 1991;8:82-9
2. WONCA. Key words in Family Medicine (A The-saurus). FAMILI 1989;10:XI-XVIII.
3. BIREME. Descritores em ciências da saúde (DeCS). São Paulo: Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde, 1988.

### ANEXO

#### DECLARAÇÃO

Declaro que autorizo a publicação do artigo junto, com o título \_\_\_\_\_

do qual sou autor (ou co-autor). Declaro ainda que o presente artigo é original, não foi objecto de qualquer outro tipo de publicação, nem foi proposto simultaneamente para publicação em outras revistas ou jornais. Declaro também que os requisitos sobre autoria definidos nas normas de Vancouver foram respeitados, bem como que li e concordo inteiramente com o conteúdo do presente artigo.

Data \_\_\_\_\_

Assinatura(s) \_\_\_\_\_

### Lista de Verificação para Preparação de Artigos para a Revista Portuguesa de Clínica Geral

#### PRIMEIRA PÁGINA

- O título é conciso, breve e suficientemente informativo.
- Os nomes dos autores estão correctos e são os 2/3

nomes usados habitualmente na Clínica ou nas actividades científicas.

- Estão indicados os graus ou títulos dos autores.
- Estão indicados os locais, instituições ou serviços aos quais os autores estão ligados.

#### SEGUNDA PÁGINA

- Está indicado o nome, telefone/fax e endereço do autor responsável pela correspondência com a revista acerca do manuscrito.
- Está indicado o nome e endereço do autor a quem deve ser dirigida a correspondência sobre o artigo após a sua publicação na revista.

#### TERCEIRA PÁGINA

- Está indicado o título do artigo.
- O Resumo segue as normas da revista para o tipo de artigo em questão.
- Estão indicadas duas a seis palavras-chave adequadas.

#### PÁGINAS SEGUINTE

- O texto do artigo segue as normas da revista e não excede os limites previstos.
- O texto está correctamente dactilografado a 2 espaços, sem rasuras.
- Cada uma das secções do artigo começa no início de uma página.
- As referências bibliográficas estão correctamente assinaladas e numeradas ao longo do texto.
- As ilustrações estão devidamente assinaladas no texto e numeradas pela ordem por que são mencionadas.
- As figuras estão numeradas com algarismos árabes e os quadros com numeração romana.

#### PRIMEIRA PÁGINA A SEGUIR AO TEXTO (REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS)

- As referências bibliográficas estão devidamente assinaladas no texto.
- Os documentos referenciados foram cuidadosamente verificados e estão listados de acordo com as normas de Vancouver.

#### PRIMEIRA PÁGINA A SEGUIR A REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (AGRADECIMENTOS QUANDO EXISTEM)

- Respeitam rigorosamente as normas internacionalmente aceites, existindo nomeadamente as autorizações para citar os nomes de pessoas a quem se agradecem os contributos.

#### ILUSTRAÇÕES

- Todos os quadros estão dactilografados a dois espaços, numerados e têm título adequado.
- Não existem linhas de separação horizontais ou verticais no interior dos quadros, com excepção das linhas de separação de títulos, subtítulos e notas de rodapé.
- Todas as restantes ilustrações estão numeradas e identificadas.
- Todas as ilustrações têm qualidade que permita a sua reprodução directa.
- Cada ilustração está devidamente assinalada no texto e é apresentada em separado.
- Fotografias ou diapositivos estão devidamente identificados (algarismos árabes) com etiqueta autocolante no verso ou na margem.

#### ÚLTIMA PÁGINA

- As legendas para as ilustrações estão dactilografadas a dois espaços e identificadas com o correspondente algarismo árabe ou número romano.

#### PEDIDO DE PUBLICAÇÃO

- É enviada disquete gravada em formato ASCII, ou ficheiro anexo a mensagem de correio electrónico, com o original do texto (incluindo ilustrações).
- A carta de pedido de publicação está assinada por todos os autores e é enviada por correio postal.
- Uma declaração de teor igual ou idêntico ao apresentado na Declaração modelo anexa às Normas da revista está assinada por todos os autores e é enviada por correio postal.
- São enviados por correio postal os originais de fotografias em suporte de papel ou filme (diapositivos).
- Estão prontas cópias de todas as autorizações necessárias para a publicação e são enviadas por correio postal.
- Está preenchida e é enviada por correio postal esta lista de verificação.
- Todo o conjunto de documentos está dirigido ao Director da Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo.