



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

PATRÍCIA MARQUES ALVES

***PATOGENIA IMUNOGENÉTICA DA DOENÇA DE
ADDISON AUTO-IMUNE: UMA REVISÃO***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE ENDOCRINOLOGIA

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
PROFESSORA DOUTORA MANUELA CARVALHEIRO**

DR.^a ISABEL PAIVA

OUTUBRO/2012

Índice

Lista de Abreviaturas.....	1
Abstract	2
Resumo	3
I. Introdução	4
II. Materiais e Métodos	6
III. Doença de Addison auto-imune	7
A. AAD isolada e associada a síndromes poliglandulares auto-imunes	7
1. APS tipo 1	8
2. APS tipo 2	9
3. APS tipo 3 e 4.....	10
4. APS incompletas	11
B. Estádios da AAD.....	11
C. Fisiopatologia e histopatologia da AAD	13
1. Patogénese da AAD: Hipótese	15
2. Auto-antígenios na AAD.....	16
a) Epítomos indutores de auto-reactividade	17
3. Auto-anticorpos presentes na AAD.....	19
a) ACA e anticorpos anti-21OH: preditores de desenvolvimento de AAD	20
b) StCA e outros anticorpos	24
c) Papel dos auto-anticorpos na patogénese da AAD	26
4. Imunidade celular: papel das células T e citocinas na patogénese da AAD.....	27
a) Auto-reactividade celular.....	27
b) Desencadeantes da auto-reactividade celular: epítomos imunodominantes	29
c) Consequência da auto-reactividade celular: destruição adrenocortical.....	30
5. Susceptibilidade genética na AAD	31
a) AAD associada à APS tipo 1	31
b) AAD não associada à APS tipo 1	31
i. Alelos dos genes HLA classe II: <i>loci</i> DRB1, DQA1e DQB1	32
ii. Alelos dos genes HLA classe I e classe II: haplótipo A1-B8-DR3	33
iii. Regiões entre os genes HLA classe I e II: alelos do gene MICA e do microssatélite D6S273	34
iv. Alelos com associação negativa para a AAD: protectores de progressão?....	35
v. Outros genes de susceptibilidade	36
IV. Discussão e Conclusão.....	40
V. Anexo 1	46
VI. Anexo 2.....	47
VII. Anexo 3.....	48
VIII. Referências	49

Lista de Abreviaturas

17OH	17 α -hidroxilase	LYP	Tirosina fosfatase linfóide
21OH	21-hidroxilase	MHC	Complexo de histocompatibilidade <i>major</i>
AAD	Doença de Addison Auto-imune	MHC2TA (ou CIITA)	“MHC classe II transactivator”
ACA	Anticorpos anti-córtex adrenal	MIP	“Macrophage inflammatory protein”
ADAM3A	Gene que codifica as proteínas desintegrina e metaloproteinase domínio 3A	MICA	“MHC class I chain-related sequence A”
AIRE	“Autoimmune regulator”	MICB	“MHC class I chain-related sequence B”
APS	Síndrome (s) poliglandular(es) auto-imune(s)	NALP1 (ou NRLP1)	“NACHT leucine rich repeats protein 1”
BAT-1	“B-associated transcript”	NRLP1 (ou NALP1)	“NLR family, pyrin domain containing 1”
CIITA (ou MHC2TA)	“MHC class II transactivator”	NRL	“NOD like receptors”
CLEC16A	“C-type lectin domain family 16, member A”	NOD	“Nucleotide oligomerization domain”
CNV	“Copy number variations”	PD-L1	“Programmed death ligand 1”
CPR	NADPH-citocromo P450 reductase	PRA	Actividade da renina plasmática
CTLA-4	“Cytotoxic T lymphocyte antigen-4”	PTPN22	“Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 22”
CXCL-10 (ou IP-10)	Proteína-10 induzível por interferão	SCC	“Cholesterol side-chain cleavage enzyme”
HLA	“Human leukocyte antigen”	SNP	“Single nucleotide polymorphisms”
IA2	“Second islet autoantigen”	StCA	“Steroid producing cell autoantibodies”
ICA	Anticorpos anti-ilhéus pancreáticos	Terminal C	Terminal carboxil (COOH)
IFN	Interferão	Terminal N	Terminal amino (NH ₂)
IL	Interleucina	TLR	“Toll-like receptor”
IP-10 (ou CXCL-10)	Proteína-10 induzível por interferão	TNF	Factor de necrose tumoral
		UGT2B28	Uridina-difosfato-glucuronosil-transferase família 2, polipeptídeo B28

Nota: Foram utilizadas as **abreviaturas internacionais**.

Este artigo está escrito segundo as normas **anteriores** ao Novo Acordo Ortográfico.

Abstract

Autoimmune Addison's disease is the most common cause of primary adrenal insufficiency. Despite its simple diagnosis and treatment, the former is often delayed because of the insidious symptoms; the latter, due to its inability to restore the physiological levels of corticosteroids, has been suggested to increase patients' morbidity and mortality. This article provides an update on the pathogenesis of autoimmune adrenal insufficiency. An online search of literature covering all years from 2000 to 2012 was conducted on "PubMed" to address the pathogenesis of adrenal autoimmunity. Articles cited in the reference list of others articles were also included and others from Portuguese and Brazilian journals as well. There's compelling evidence that 21-hydroxylase autoantibodies and specific T-cell responses to certain epitopes of this enzyme, as well as several cytokines (such as IFN- γ) and interleukins can be considered markers of autoimmunity. The measurement of 21-hydroxylase autoantibodies, as predictors of disease progression, cannot be applied to the general population. Instead, they should only be determined in the context of autoimmune polyglandular syndromes, where Addison's disease is more common. These syndromes are associated with several susceptibility genes. The autoimmune polyglandular syndrome type 1 is caused by mutations in the AIRE gene. The remaining forms of Addison's disease are associated with polymorphisms in the HLA complex and other genes. Therefore, by improving the knowledge on genetics and immunopathology in Addison's disease, one can contribute to the discovery of new insights on its prevention, diagnosis and treatment.

Keywords: Addison's disease, autoimmunity, 21-hydroxylase, autoantibodies, epitopes, T-lymphocytes, HLA complex, autoimmune polyglandular syndromes.

Resumo

A doença de Addison Auto-imune é a principal causa de insuficiência suprarrenal primária. Embora o seu diagnóstico e tratamento sejam relativamente simples, o primeiro é muitas vezes atrasado devido à clínica insidiosa; o segundo, dado não restabelecer os níveis fisiológicos dos corticosteróides, é relacionado com um aumento na morbidade e mortalidade dos doentes. Este artigo fornece uma revisão sobre a patogénese da insuficiência suprarrenal auto-imune. Através do motor de pesquisa “PubMed”, foram avaliados artigos publicados entre 2000 e 2012 e relacionados com a patogénese da autoimunidade suprarrenal. Também se seleccionaram artigos presentes nas referências dos artigos previamente analisados e outros de revistas portuguesas e brasileiras. Vários estudos sugeriram como marcadores de autoimunidade os anticorpos anti-21-hidroxilase, as células T reactivas a epítomos dessa enzima e várias citocinas (como IFN- γ) e interleucinas. A determinação de anticorpos anti-21OH, enquanto preditores de progressão para doença, não é aplicável à população geral, mas apenas a situações onde a doença de Addison é frequente, nomeadamente no contexto de síndromes poliglandulares auto-imunes. A síndrome poliglandular auto-imune tipo 1 está associada a mutações do gene AIRE, enquanto que as outras formas de doença de Addison auto-imune se relacionam com polimorfismos dos genes HLA e outros. Deste modo, o conhecimento detalhado da imunopatologia e genética pode levar à descoberta de novas práticas de prevenção, detecção precoce e a novas terapêuticas para a doença de Addison.

Palavras-chave: Doença de Addison, autoimunidade, 21-hidroxilase, auto-anticorpos, epítomos, linfócitos T, complexo HLA, síndromes poliglandulares auto-imunes.

I. Introdução

A insuficiência suprarrenal primária, ou doença de Addison, resulta de um défice na produção de glucocorticóides e mineralocorticóides (1, 2). É uma doença rara, com uma incidência a nível mundial de 0,8 casos por 100.000 e uma prevalência de 4 a 11 casos por 100.000 habitantes (2). A doença de Addison é mais frequente em mulheres e é tipicamente diagnosticada por volta dos 30 anos (3).

As causas desta patologia agrupam-se em três categorias: disgenesia suprarrenal (inclui a hipoplasia suprarrenal congénita), destruição do córtex das glândulas suprarrenais (autoimunidade, infecções, adrenoleucodistrofia, metástases tumorais, linfoma, amiloidose, hemorragia, enfarte e iatrogenia) e défice na síntese de corticosteróides (hiperplasia suprarrenal congénita, entre outros) (1, 2, 4-6).

Devido à sua clínica insidiosa, o seu diagnóstico é, por vezes, tardio (1). Foi estimado que cerca de 60% dos indivíduos tiveram de recorrer a dois ou mais médicos antes de serem correctamente diagnosticados (4). O diagnóstico desta doença faz-se pela medição dos níveis matinais de cortisol e de ACTH (distingue insuficiência primária de secundária), confirmada pela medição de cortisol após estimulação com tetracosactídeo (análogo da ACTH) (1, 5).

Assim que a doença de Addison é diagnosticada e os doentes iniciam terapia de substituição, a sua esperança média de vida é considerada igual à da população em geral (7). No entanto, foi demonstrado que o risco relativo de morte nesses doentes era duas vezes superior ao da população geral (8). De facto, se a etiologia for auto-imune, outras doenças auto-imunes podem estar presentes, o que vai ampliar a sua morbilidade e mortalidade (8). Por outro lado, a terapia de substituição não mimetiza o padrão da secreção fisiológica do cortisol. Assim, origina períodos de défice e de excesso de corticosteróides circulantes, que resultam em incapacidade de resposta a infecções e complicações cardiovasculares, entre outros (8, 9).

A autoimunidade é a causa mais frequente da doença de Addison, constituindo 60 a 90% dos casos (1-4). A presença de anticorpos anti-córtex adrenal (ACA) é um indicador de autoimunidade, sendo a enzima 21-hidroxilase (21OH) o auto-antígeno principal (3, 10-12). Deste modo, os anticorpos anti-21OH constituem o marcador imunológico *gold standard* para o diagnóstico clínico e pré-clínico da doença de Addison Auto-imune (AAD) (13).

A AAD pode ocorrer isolada ou associada a outras doenças auto-imunes órgão-específicas, constituindo neste caso as síndromes poliglandulares auto-imunes (APS) (tipos 1, 2, 3 e 4) (1-4, 6, 12). A APS tipo 1 inicia-se na infância ou adolescência (3, 4, 6). É uma doença autossômica recessiva causada por mutações no gene AIRE (“autoimmune regulator”), envolvido no processo de tolerância imunitária central (2-4, 6, 10-12). Por outro lado, a AAD isolada ou no contexto de outras APS, tem sido associada a haplótipos DR3 e DR4 dos genes HLA (“human leukocyte antigen”) (2-4, 6, 10-12, 14). Estes genes codificam moléculas responsáveis pela apresentação de antígenos às células T. Outros genes envolvidos na regulação do sistema imunitário foram também associados a estas formas de AAD (3, 4, 6, 10-12).

As manifestações clínicas da AAD só se tornam evidentes quando há destruição de 90% das células adrenocorticais (4, 10), pelo que a detecção dos anticorpos anti-21OH se reveste de extrema importância no diagnóstico precoce, particularmente em indivíduos portadores dos genes ditos de susceptibilidade. Contudo, os anticorpos parecem funcionar apenas como marcadores do processo de destruição auto-imune, mediado por células T auto-reactivas (3, 10-12), que podem ser consideradas como efectoras da AAD, abrindo novas perspectivas no diagnóstico e, eventualmente, na terapêutica desta doença.

Este artigo pretende rever os conhecimentos actuais sobre a patogénese da AAD, integrando-os numa vertente sistemática e dinâmica, de modo a perspectivar novas abordagens diagnósticas e terapêuticas.

II. Materiais e Métodos

A literatura disponível foi avaliada para responder a questões como a incidência, mortalidade, diagnóstico e terapêutica da doença de Addison e, particularmente, a patogénese da autoimunidade suprarrenal. Nesse sentido, foram destacados temas como auto-anticorpos, auto-antígenos e epítomos, imunidade celular, citocinas e polimorfismos genéticos de susceptibilidade.

A pesquisa da literatura iniciou-se a Fevereiro de 2012. Recorrendo ao motor de pesquisa “PubMed”, foram identificados artigos publicados entre 2000 e 2012, utilizando as seguintes palavras-chave: “Addison’s disease” ou “adrenal insufficiency” e “prevalence”, “incidence”, “mortality” e “autoimmunity” – ou “Autoimmune Addison’s disease” ou “adrenal autoimmunity” – e “adrenal cortex”, “autoantibodies”, “steroid 21-hydroxylase”, “autoantigens”, “epitopes”, “cellular immunity”, “autoimmune polyglandular syndromes”, “Major Histocompatibility Complex”, “HLA complex”, “polymorphisms”. Foram também analisados artigos da *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo* e dos *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. Posteriormente efectuou-se uma pesquisa manual, baseada nas referências dos artigos seleccionados, não tendo sido restrita ao ano de publicação.

III. Doença de Addison auto-imune

Inicialmente classificada como idiopática, a AAD passou a ser assim designada por incluir na sua patogenia critérios das doenças auto-imunes (15). A doença de Addison auto-imune reúne, pois, os seguintes aspectos (3):

- Imunidade celular reactiva a antígenos do córtex suprarrenal;
- Associação com antígenos do complexo de histocompatibilidade *major* (MHC);
- Histopatologia característica, com infiltrado mononuclear difuso;
- Associação com outras doenças auto-imunes órgão-específicas;
- Susceptibilidade genética.

A. AAD isolada e associada a síndromes poliglandulares auto-imunes

A identificação de indivíduos com risco de desenvolver AAD na população é muitíssimo limitada, devido à baixa incidência desta doença. Os melhores candidatos a quem pesquisar o risco de desenvolver falência suprarrenal auto-imune clinicamente evidente são aqueles que já foram diagnosticados com outras doenças auto-imunes órgão-específicas, especialmente diabetes mellitus tipo 1 e tiroidites auto-imunes (16).

Por sua vez, os indivíduos diagnosticados com AAD são afectados por outras doenças auto-imunes mais frequentemente do que aqueles com insuficiência suprarrenal não auto-imune. Por ordem decrescente de frequência, a AAD está associada a doenças auto-imunes da tiróide, gastrite atrófica crónica, diabetes mellitus tipo 1, hipoparatiroidismo, hipogonadismo, vitiligo, alopecia, doença celíaca, anemia perniciosa, esclerose múltipla, doença intestinal inflamatória, síndrome de Sjögren, hepatite crónica e hipofisite linfocítica (3).

Num estudo publicado em 1996 (17), alguns dos doentes com AAD apresentavam alterações serológicas compatíveis com autoimunidade dirigida a um ou mais órgãos, que não as suprarrenais.

As síndromes poliglandulares auto-imunes são classificadas em quatro tipos, consoante a agregação de patologias presente (Anexo 1).

1. APS tipo 1

A síndrome poliglandular auto-imune tipo 1 é caracterizada por três entidades clínicas principais: candidíase muco-cutânea crónica, hipoparatiroidismo crónico e doença de Addison (2, 3, 6, 12, 18, 19), sendo necessárias pelo menos duas destas para fazer o diagnóstico (12, 19). O diagnóstico da APS tipo 1 ocorre, geralmente, em indivíduos mais jovens que as outras APS (2, 3, 6). O hipoparatiroidismo surge após os 10 anos de idade e a AAD após os 15 anos, sendo que afecta até 93% destes (3). A síndrome é muito rara, embora existam áreas geográficas que apresentam maior frequência, como a Finlândia, a Sardenha e a comunidade Judaica Iraniana (3, 6, 12, 18). O *ratio* mulher: homem varia entre 4:5 e 2,4:1 (3, 18).

Geralmente, a expressão clínica dos três componentes diagnósticos segue uma ordem cronológica: primeiro surge a candidíase muco-cutânea, seguida do hipoparatiroidismo e depois a doença de Addison (2, 3, 6).

A candidíase muco-cutânea crónica está relacionada com um defeito a nível dos linfócitos T (3, 18, 19). Recentemente foi sugerido que a presença de auto-anticorpos contra as interleucinas IL-17A, IL-17F e IL-22 poderia causar candidíase mucocutânea crónica na APS tipo 1 (28). Estas citocinas estão associadas a um subconjunto de células T – as células Th17 (10).

Quanto ao hipoparatiroidismo, foram detectados três tipos de auto-anticorpos em provável associação (3, 18, 19): anticorpos dirigidos contra um antigénio mitocondrial de massa molecular de 46kDa; anticorpos contra a superfície das células das paratiróides, com capacidade para inibir a secreção de PTH e anticorpos contra o domínio extracelular do receptor-sensor de cálcio (“calcium-sensing receptor”). Como estes últimos ainda estão por

confirmar e os dois primeiros são anticorpos pouco específicos, o hipoparatiroidismo crónico não tem marcadores serológicos definidos.

Outro estudo (29) identificou a presença de anticorpos contra IFN- α e IFN- ω em doentes com APS tipo 1. São interferões importantes para o sistema imune inato, ao serem expressos após activação por “Toll-like receptors” (TLRs). Estão também associados às respostas celulares por linfócitos Th1.

Podem ocorrer outras manifestações que isoladamente não constituem factores de diagnóstico para a APS tipo 1 (3): são designadas de manifestações clínicas *minor* (Anexo 1). Os anticorpos associados a estas manifestações estão referidos na Tabela 1.

2. APS tipo 2

A síndrome poliglandular auto-imune tipo 2 é caracterizada pela presença de doença de Addison associada a patologia tiroideia auto-imune e a diabetes mellitus tipo 1 (2, 3, 6, 12, 16, 18, 19). Em cerca de 15% dos casos, estão presentes os três componentes principais (16), sendo que geralmente a diabetes mellitus surge antes da AAD e as tiroidites podem surgir antes, depois ou concomitantemente com ela (3). É uma síndrome rara, com uma incidência de cerca de 3 casos por cada 100.000 habitantes, afectando sobretudo mulheres (*ratio* mulher:homem aproximadamente 3). É raro o seu aparecimento na infância (3, 18); as manifestações clínicas *minor* estão indicadas no Anexo 1.

Esta APS está relacionada com a presença de auto-anticorpos anti-21OH (marcadores da AAD), anti-ilhéus pancreáticos, anti ácido glutâmico descarboxilase e anti-IA2 (“second islet autoantigen”) (marcadores de diabetes mellitus tipo 1), anti-peroxidase e anti-tiroglobulina (tiroidite crónica auto-imune), anti-receptor de TSH (doença de Graves) (3, 6, 16, 18). Podem estar também presentes anticorpos marcadores de outras doenças auto-imunes (Tabela 1 e Anexo 1).

3. APS tipo 3 e 4

A APS tipo 3 é caracterizada pela associação de tiroidites auto-imunes com outras doenças auto-imunes, excepto a AAD, e com outras doenças inespecíficas (doenças dos colagénio, vasculites). A APS tipo 4 é constituída por combinações de endocrinopatias auto-imunes não incluídas nas APS tipo 1, 2 e 3 (3, 18).

Embora a doença de Addison não esteja presente na APS tipo 3, foram detectados ACA em cerca de 11% de doentes com APS tipo 3 (30).

Os anticorpos presentes nas serologias dos doentes com APS tipo 4 poderão ser vários, incluindo os anticorpos anti-21OH, bem como outros, indicados na Tabela 1.

Manifestação clínica	Auto-anticorpos
Hipogonadismo hipergonadotrófico,	StCA Anti-17OH Anti-SCC
Patologia tiroideia auto-imune	Anti-peroxidase Anti-tiroglobulina
Hepatite auto-imune	Anti-microssomais rim-fígado Anti-CYP1A2 e anti-CYP2A6 (citocromo P450)
Alopécia areata	Anti-tirosina hidroxilase
Vitiligo	Anti-melanócitos (complement-fixing) Anti-factores de transcrição (SOX9, SOX 10)
Diabetes mellitus tipo 1	Anti-ilhéus pancreáticos (ICA) Ácido glutâmico descarboxilase Anti-IA2 (“second islet autoantigen”)
Gastrite atrófica	Anti-células parietais gástricas
Anemia perniciosa	Anti-factor intrínseco
Doença celíaca	Anti-reticulina Anti-endomísio Anti-transglutaminase
Mal-absorção	Anti-triptofano hidroxilase

Tabela 1. Auto-anticorpos presentes em algumas das manifestações clínicas das APS.

4. APS incompletas

Os três tipos de APS associados a doença de Addison podem ser incompletos (3, 18): são assim considerados quando estão presentes uma ou mais das entidades clínicas *major*, juntamente com auto-anticorpos marcadores de outras patologias, também elas consideradas *major*, mas cuja expressão clínica ainda não é evidente.

A AAD isolada pode ser considerada como uma APS incompleta, indicando risco para outras endocrinopatias auto-imunes. Assim, deve fazer-se o rastreio periódico de auto-anticorpos marcadores das outras manifestações, nomeadamente contra células tiroideias, células parietais gástricas, factor intrínseco, células dos ilhéus pancreáticos, entre outros (3) (Tabela 1). Cerca de 48% dos doentes com AAD isolada têm serologias positivas para estes anticorpos. Além da pesquisa de auto-anticorpos também devem ser realizados testes funcionais órgão-específicos (tiróide, mucosa gástrica, pâncreas endócrino). Na presença de auto-anticorpos, com testes funcionais normais, estes devem ser repetidos periodicamente. O diagnóstico de AAD isolada pode, pois, ter de ser alterado para APS tipo 1, 2 ou 4, à medida que se vão a manifestando outras alterações características destas síndromes (3).

B. Estádios da AAD

Como já foi referido, devido à baixa incidência da AAD na população em geral, os melhores indivíduos para estudar o risco de a desenvolver são aqueles com outras endocrinopatias auto-imunes (16), diagnosticados ou não com APS tipo 1, 2, ou 4, completa ou incompleta. Isto porque grande parte desses indivíduos têm serologia positiva para ACA ou anticorpos anti-21OH, mesmo não tendo ainda manifestações clínicas ou laboratoriais de AAD (3, 6, 13, 16, 18, 19).

Deste modo, pode-se estabelecer uma classificação dos estádios de evolução da AAD, desde adrenalite auto-imune com função suprarrenal normal, até doença de Addison clinicamente evidente. A Tabela 2 indica esses estádios.

Esta classificação pode ser aplicada a todos os indivíduos com serologia positiva para ACA, ou anticorpos anti 21OH, ou com susceptibilidade genética para desenvolver AAD (3).

O estágio 2 representa uma fase crítica de deterioração do córtex suprarrenal, podendo ser considerado como um ponto sem retorno na falência suprarrenal (13). A zona glomerulosa é a primeira a ser atingida, seguida da zona fasciculata, devido a uma maior resistência desta última (3). É por isso que, quando do seu atingimento, se considera que a falência suprarrenal se torna irreversível (estádio 2). Foi, pois, sugerido que os pacientes que se encontrassem nesse estágio fossem considerados para terapia de substituição precoce (13).

Estádio	Função suprarrenal	Outros	Classificação
Estádio 0	<ul style="list-style-type: none"> • Níveis séricos basais de ACTH normais • Níveis séricos de cortisol normais, após teste de estimulação com ACTH 	Sem envolvimento das camadas corticais	Adrenalite auto-imune com função suprarrenal normal
Estádio 1	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da PRA com níveis séricos de aldosterona normais ou baixos 	Envolvimento da zona glomerulosa	Insuficiência suprarrenal subclínica
Estádio 2	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuição da resposta de cortisol, após teste de estimulação com ACTH 	Envolvimento da zona glomerulosa e da zona fasciculata	
Estádio 3	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento dos níveis séricos de ACTH • Níveis basais de cortisol no limite inferior do normal • Níveis basais de aldosterona diminuídos • Ausência de resposta de cortisol, após teste de estimulação com ACTH 		
Estádio 4	<ul style="list-style-type: none"> • Níveis basais de cortisol e aldosterona diminuídos 		AAD clínica

Tabela 2. Estádios da AAD. (Referências: 3, 13, 16)

C. Fisiopatologia e histopatologia da AAD

Com a evolução da doença, as três camadas do córtex suprarrenal são gradualmente destruídas, sendo depois substituídas por tecido fibroso. Os níveis das hormonas esteróides só descem significativamente quando cerca de 90% das células adrenocorticais são destruídas (4, 10).

Durante a fase activa da doença, ocorre infiltração difusa das glândulas por células mononucleares (linfócitos, plasmócitos, macrófagos). Este padrão é idêntico na AAD isolada e na AAD associada a APS (10, 12). Em doentes com APS tipo 1, foi possível observar um infiltrado mononuclear nas glândulas paratiróides (18), pelo que se pode concluir que o processo patogénico de agressão auto-imune órgão-específica é idêntico nas diferentes manifestações dos vários tipos de APS, incluindo a AAD. No estágio final de destruição do córtex suprarrenal, apenas as células da medula conservam a sua estrutura (3).

Os mecanismos pelos quais ocorre a destruição do córtex suprarrenal ainda não são bem compreendidos, nomeadamente os processos de actuação dos componentes celulares e moleculares do infiltrado, correspondentes à iniciação e perpetuação da autoimunidade. Foi sugerido que esses mecanismos estariam dependentes de factores genéticos, ambientais e endógenos (10).

A AAD isolada e a AAD no contexto de APS tipo 2 e tipo 4 estão associadas a polimorfismos de genes que influenciam o sistema imunitário, tais como os genes HLA classe II e outros (2, 3, 6, 10-12, 14). Na APS tipo 1 ocorrem alterações no mecanismo de tolerância imunitária central (importante para evitar a autoimunidade) devido a mutações no gene AIRE (2-4, 6, 10-12, 18).

Estas alterações genéticas são necessárias para o desenvolvimento da autoimunidade mas não são suficientes. Acredita-se, pois, na influência de agressores ambientais como infecções, fármacos ou *stress* (31). O desenvolvimento de autoimunidade múltipla pode estar

relacionado com a partilha de epítomos entre agentes ambientais e antigénios comuns apresentados nos vários órgãos endócrinos (31). Outra hipótese mais antiga tem a ver com a origem germinativa dos órgãos endócrinos (32); neste caso, ao derivarem da mesma camada germinativa, poderão possuir antigénios comuns, que funcionem como o alvo, activando a resposta auto-imune nas APS.

Nas apresentações sugestivas de AAD, o método de diagnóstico mais eficaz é a confirmação de serologia positiva para anticorpos anti-21OH (13, 33). No entanto, embora possam ser importantes para a patogénese da AAD, têm maior tendência para serem considerados marcadores do processo auto-imune de destruição adrenocortical, mediado por células T (3, 10-12, 33).

As células adrenocorticais não são apenas um alvo passivo de destruição auto-imune, antes desempenham uma função activa no processo (34), dado produzirem citocinas – como interleucinas (IL-1, IL-6, IL-18) –, factor de necrose tumoral (TNF- α) e a proteína-10 induzível por interferão (IP-10 ou CXCL-10) (35).

Os TLRs são um grupo de receptores muito importantes para o sistema imunitário inato. São também expressos nas células adrenocorticais, modulando a sua resposta ao *stress*. Foi comprovado que a deficiência dos TLR 2 e 4 levou a falência suprarrenal (36).

Normalmente, o córtex suprarrenal interage com o sistema imunitário, através de macrófagos, células dendríticas e linfócitos locais (37). As células dendríticas locais têm a capacidade de apresentar antigénios do órgão onde se encontram, às células T presentes nos gânglios linfáticos de drenagem local (38). Deste modo, na ausência de desenvolvimento de tolerância imunitária central e periférica (papel das células T reguladoras, ver à frente) (39), este processo pode levar à activação de células T CD4+ e/ou TCD8+ auto-reactivas (10).

Durante a fase activa da AAD, as células adrenocorticais aumentam a expressão de moléculas MHC classe II (12, 35). Este processo é induzido pelo interferão gama (IFN- γ) que

é libertado por células T (35). Por outro lado, as células T auto-reativas são estimuladas pelas células adrenocorticais, devido à sua expressão de moléculas MHC classe II e à produção de citocinas, conduzindo a um ciclo vicioso de activação celular imuno-mediada (10).

1. Patogénese da AAD: Hipótese

Perante estes factos, foi estabelecida uma hipótese sobre a patogénese do processo auto-imune de destruição do córtex suprarrenal (10). Os autores dessa hipótese consideram que esse processo decorre em três fases: iniciação, perpetuação e destruição adrenocortical. Durante a iniciação, há uma acumulação e activação de células apresentadoras de antígeno (células dendríticas) no córtex suprarrenal. Este processo pode ocorrer devido a vários desencadeantes, como infecções virais subclínicas ou situações de *stress*, que induzem uma resposta metabólica excessiva do córtex suprarrenal. Como a enzima 21OH é muito abundante na glândula, é possível que peptídeos derivados desta proteína sejam captados pelas células dendríticas e transportados para os nódulos linfáticos locais. Aqui, as células dendríticas vão ser responsáveis pela activação inicial das células T. Segue-se, então, a fase de perpetuação, onde ocorre expansão clonal de células B e T auto-reativas, com proliferação de plasmócitos produtores de auto-anticorpos. A proliferação das células T auto-reativas depende dos processos de tolerância imunitária central e periférica. Estes, por si só, têm uma relação estreita com a susceptibilidade genética de cada indivíduo.

Assim, a destruição do córtex suprarrenal vai resultar: do efeito das células T citotóxicas; de citocinas (como IFN- γ) libertadas pelas células T CD4+, pelos macrófagos e pelas próprias células adrenocorticais e da activação do sistema de complemento pelos auto-anticorpos.

2. Auto-antigénios na AAD

Os auto-antigénios reconhecidos na AAD correspondem a três enzimas da família citocromo P450: a 21OH (específica da suprarrenal), a 17 α -hidroxilase (17OH; presente nas suprarrenais e gónadas) e a “cholesterol side-chain cleavage enzyme” (SCC; expressa nas suprarrenais, gónadas e placenta) (3).

A 21OH converte a 17-OH-progesterona em 11-desoxicortisol e progesterona em 11-desoxicorticosterona. A 17OH converte pregnenolona em 17-OH-pregnenolona e dehidroepiandrosterona. A SCC converte colesterol em pregnenolona (3). A actividade destas três enzimas depende da NADPH-citocromo P450 reductase (CPR) (3, 40). As enzimas 21OH e SCC estão presentes nas três camadas do córtex suprarrenal, enquanto que a 17OH está localizada principalmente nas camadas fasciculata e reticular (3).

A enzima 21OH é o principal auto-antigénio envolvido no processo de autoimunidade suprarrenal (3, 10-12, 40-43). É codificada pelo gene CYP21A2, localizado no braço pequeno do cromossoma 6, banda 21, sub-banda 3 (6p21.3) (42). É uma enzima microssómica que contém um grupo heme na sua constituição (40, 43). O local de ligação ao grupo heme e o local de interacção com a CPR situam-se na região terminal COOH (carboxil – terminal C) da molécula da enzima 21OH (40). Os auto-anticorpos interferem com a actividade da enzima 21OH, pelo menos *in vitro*, provavelmente devido à inibição da fase rápida da transferência de electrões da CPR para a 21OH (40).

Na hipótese estipulada por Bratland et al (10), foi referido que, durante a fase de iniciação, ocorreria uma translocação de auto-antigénios do córtex suprarrenal para os nódulos linfáticos locais. Devido à abundância de enzimas como a 21OH (e também a 17OH e SCC) nas células adrenocorticais, seriam os peptídeos derivados dessas enzimas os captados pelas células dendríticas.

A 21OH é o auto-antigénio principal para as células B e também para as células T auto-reactivas na AAD isolada ou associada a APS (33, 44). Noutras doenças auto-imunes órgão-específicas, como as da tiróide, as células B e T reagiram à mesma proteína, mas para diferentes epítomos desta (45).

a) Epítomos indutores de auto-reactividade

Sugeriu-se que, nas doenças auto-imunes órgão-específicas, os epítomos para os quais os anticorpos são reactivos se localizam em domínios funcionais dos auto-antigénios (42). Num estudo sobre miastenia gravis, os epítomos reconhecidos pelos auto-anticorpos correspondiam a domínios funcionais de proteínas (46). Em relação à AAD, diversos estudos demonstraram a relação entre os locais de ligação aos anticorpos e locais importantes para a actividade da enzima.

Os anticorpos apresentam reactividade contra epítomos conformacionais localizados nas regiões central e terminal C (aminoácidos 241 a 494), mas não na região terminal NH₂ (terminal N) da 21OH (3, 16, 33, 40, 42, 47). A região terminal C está envolvida na interacção com a CPR, na ligação ao grupo heme e na ligação aos esteróides (3, 40). É, pois, uma região importante para a actividade enzimática da 21OH.

Num estudo sobre a influência das mutações genéticas da 21OH na ligação dos anticorpos à enzima (42), concluiu-se que o resíduo de arginina na posição 483 (região terminal C) tem um papel crítico na formação do epítomo auto-antigénico. Isto porque a mutação que leva à substituição do resíduo arginina por prolina compromete a actividade da 21OH e inibe a ligação dos anticorpos. Resultados semelhantes foram encontrados na mutação que induz a substituição de prolina por serina, na posição 453. Deste modo, estas duas regiões têm funções enzimáticas críticas, actuando também como epítomos tridimensionais no terminal C da 21OH.

Foi sugerido que as diferenças na progressão para AAD entre crianças e adultos podiam estar relacionadas com a heterogeneidade da reactividade dos anticorpos à 21OH. Deste modo, indivíduos com anticorpos para epítomos particulares seriam mais susceptíveis para desenvolver a doença (48, 49). No entanto, em indivíduos com AAD, não foi demonstrada uma inibição da 21OH *in vivo* pelos anticorpos, uma vez que não foi demonstrado um aumento da 17-OH-progesterona (substrato da 21OH), mas sim uma diminuição desta, juntamente com as outras hormonas esteróides (50). Ainda assim, as variações na autoimunidade humoral (por exemplo, reactividade a diferentes epítomos) podem reflectir variações nas respostas das células T, que provavelmente são os mediadores principais do processo de destruição auto-imune (3, 10-12, 33, 44).

Rottembourg et al (33) sugeriram que, na AAD, as células B e T poderiam ter reactividade para as mesmas regiões de epítomos, particularmente no terminal C. Estes autores determinaram a afinidade das células T a certos peptídeos da 21OH, em doentes com AAD. O peptídeo constituído pelos aminoácidos das posições 431 a 450 foi detectado em 31% dos doentes testados. Este peptídeo está localizado na região terminal C, já referida como uma zona importante para a actividade da enzima 21OH (3, 33, 40).

Por outro lado, foi identificado um epítomo constituído pelos aminoácidos das posições 342 a 361 da proteína 21OH, que induziu a produção de IFN- γ pelas células T em doentes portadores do haplótipo HLA-DRB1*0404 (51). Isto veio confirmar os resultados do estudo anterior de Husebye et al (44), onde as células T de ratinhos imunizados proliferaram em resposta à 21OH, reagindo com um dos seus peptídeos constituído pelos aminoácidos das posições 342 a 361. Já outro peptídeo de outra região (correspondente aos aminoácidos das posições 191 a 202) não pareceu induzir respostas proliferativas. O peptídeo constituído pelos aminoácidos das posições 342 a 361, considerado imunodominante, corresponde a parte do

local de ligação às hormonas esteróides, uma região relativamente conservada da molécula da 21OH (44, 51).

3. Auto-anticorpos presentes na AAD

Os auto-anticorpos anti-córtex adrenal (ACA) são marcadores imunológicos para identificar indivíduos com AAD, ou com risco de a desenvolver (13), reagindo contra as três camadas celulares do córtex suprarrenal, nomeadamente contra um ou mais antigénios citoplasmáticos (3, 10, 12, 16). Produzem um padrão homogéneo citoplasmático à imunofluorescência indirecta (3).

A enzima 21OH é o alvo principal dos ACA (3, 10-12). Os anticorpos anti-21OH reconhecem epítomos localizados no terminal C e região central da 21OH (aminoácidos 241 a 494), que são regiões próximas do local activo da enzima (47).

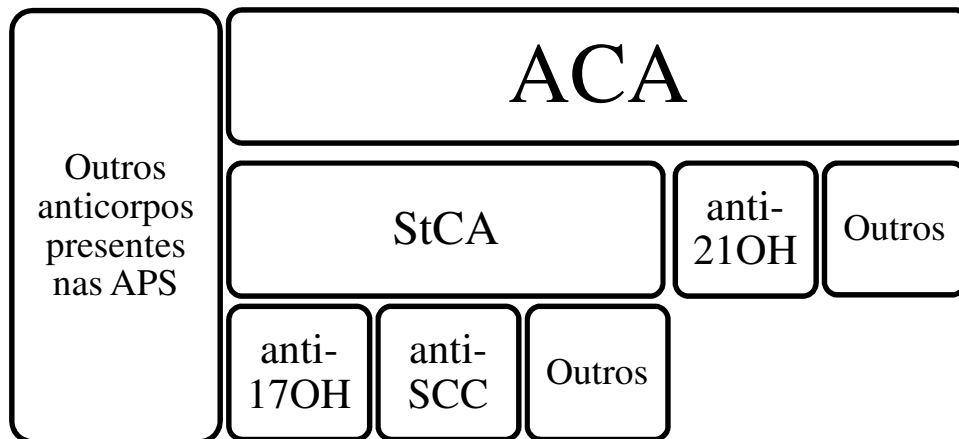
A taxa de concordância entre ACA e anticorpos anti-21OH foi de 83%, indicando uma correlação positiva significativa (30).

Os auto-anticorpos podem ser de todas as quatro subclasses de IgG (12, 16, 52). As subclasses predominantes identificadas foram IgG1, IgG2 e IgG4, com destaque para a IgG1 (16, 52). Brozzetti et al (52) verificaram que todos os indivíduos com insuficiência suprarrenal pré-clínica tinham serologia positiva para anticorpos anti-21OH da subclasse IgG1. Foi sugerido que a produção desta subclasse seria um evento precoce na história natural do processo auto-imune da doença de Addison. A produção da subclasse IgG4 pode corresponder a uma fase mais tardia do processo.

Outros auto-anticorpos, que não contra a 21OH, podem ser detectados em doentes com AAD, nomeadamente associada a APS tipo 1 e a falência ovárica prematura. São anticorpos dirigidos contra outras enzimas dependentes do sistema citocromo P450, como a SCC e a 17OH (3, 10, 12, 16, 30, 52, 53), constituindo os principais componentes dos StCA (“steroid

producing cell autoantibodies”). Quer os ACA, quer os StCA reagem contra o córtex suprarrenal, produzindo uma padrão de imunofluorescência idêntico (3, 16). Os ACA podem ou não estar presentes com os StCA. Por sua vez, os StCA, quando presentes, estão sempre associados aos ACA (3). Pode-se, pois, concluir que os StCA estão incluídos nos ACA. Contudo, pode haver anticorpos do grupo dos ACA que não são nem anti-21OH, nem StCA (13).

O Quadro 1 demonstra a hierarquia dos diferentes auto-anticorpos presentes nas diferentes formas de AAD.



Quadro 1. Hierarquia dos auto-anticorpos presentes na AAD. Os outros anticorpos presentes nas APS estão citados na Tabela 1. As duas secções identificadas como “outros”, permitem identificar anticorpos que pertencem ao grupo dos ACA, mas não são anti-21OH nem StCA, e de anticorpos que pertencem ao grupo dos StCA (e também dos ACA) mas não são anti-17OH, nem anti-SCC. (Referências: 3, 10-13, 16, 30, 52, 53)

a) ACA e anticorpos anti-21OH: preditores de desenvolvimento de AAD

Foram detectados ACA em 81% dos indivíduos com AAD (isolada e associada a APS). Em doentes com doença de Addison de causa não auto-imune não foram detectados auto-anticorpos (3). Betterle et al (53) detectaram ACA em cerca de 86% dos doentes com APS tipo 1, 89% com APS tipo 2 e 73% com AAD. Neste estudo, a prevalência de ACA nos indivíduos com doença de início recente (≤ 2 anos de duração) foi superior à dos indivíduos

com doença de longa duração (> 2 anos). Do mesmo modo, Falorni et al (54) detectaram serologias positivas para ACA em apenas 10% dos indivíduos com AAD de duração superior a 15 anos. A precisão diagnóstica dos ACA vai, assim, diminuindo ao longo da progressão da doença (16).

Os ACA e os anticorpos anti-21OH são detectados vários anos antes do início da clínica, sendo, pois, bons marcadores dos estádios pré-clínicos e clínicos da AAD. Permitem, assim, esclarecer a história natural da doença (3, 10, 12, 13, 16). Em doentes com outras doenças auto-imunes, possibilitam a identificação de indivíduos com insuficiência suprarrenal pré-clínica (55, 56). No entanto, o tempo de progressão entre os estádios de doença potencial, sub-clínica e clínica varia entre os indivíduos com serologia positiva. Os factores que determinam esta progressão não são ainda bem conhecidos (3, 13, 16).

Num estudo de seguimento de 6 anos de 100 indivíduos com ACA (13), o risco cumulativo de desenvolver AAD foi de 48,5%, tendo sido superior nas crianças, nos homens, nos indivíduos com insuficiência suprarrenal subclínica prévia, nos doentes com hipoparatiroidismo e/ou candidíase muco-cutânea crónica (em relação a outras doenças auto-imunes ou a indivíduos sem doenças auto-imunes) e nos indivíduos com títulos mais elevados de anticorpos. Assim, os autores consideraram importante o seguimento serológico de doentes com APS tipo 1, mesmo se inicialmente não tivessem ACA. Por outro lado, dos 100 indivíduos ACA-positivos, 14 não tinham anticorpos anti-21OH. Nenhum desses indivíduos desenvolveu AAD durante o período de observação. Interpretou-se este resultado como indicando que os ACA incluíssem um subgrupo de anticorpos dirigidos contra um outro auto-antígeno do córtex suprarrenal não identificado (Quadro 1). Não ficou esclarecido o risco deste subgrupo desenvolver AAD. Ainda assim, pôde-se concluir que os anticorpos anti-21OH serão marcadores mais apropriados que os ACA para calcular o risco de desenvolver AAD.

No estudo prospectivo de Betterle et al (48), com 48 indivíduos adultos com ACA, cerca de 21% desenvolveram AAD, 29% progrediram para estádios subclínicos de insuficiência suprarrenal e 50% preservaram a função suprarrenal. Todos os indivíduos que progrediram para insuficiência suprarrenal subclínica ou clínica tinham anticorpos anti-21OH, com os títulos mais elevados. Concluiu-se que a progressão para AAD era mais frequente em indivíduos com insuficiência suprarrenal sub-clínica prévia, títulos elevados de ACA e de anticorpos anti-21OH, e com o haplótipo HLA-DR3.

Estes resultados contrastaram com os de outro estudo de seguimento durante 10 anos de 22 crianças com doenças auto-imunes, 10 com ACA e 12 sem ACA (49). Todas as crianças com ACA tinham anticorpos anti-21OH, sendo que em 90% foi diagnosticada AAD após 3 a 121 meses. Não foi possível relacionar a falência suprarrenal com os títulos de anticorpos, o género, a função suprarrenal prévia, o tipo de doença auto-imune pré-existente ou haplótipo HLA-DR.

Enquanto que a velocidade de progressão para AAD em crianças foi elevada (49), apenas uma pequena fracção de indivíduos adultos desenvolveu AAD (48). As diferenças na progressão para AAD entre adultos e crianças podem estar relacionadas com a idade e as diferentes respostas celulares auto-imunes (49), sendo que o processo destrutivo auto-imune pode ocorrer mais rapidamente nas crianças, em relação aos adultos (16). Deste modo, o valor preditivo dos ACA e anticorpos anti-21OH é superior nas crianças (16, 48, 49).

Por outro lado, Brozzetti et al (52), durante um seguimento de mais de 10 anos, identificaram indivíduos com anticorpos anti-21OH que não desenvolveram AAD clinicamente evidente. Assim, a presença de anticorpos anti-21OH não implica necessariamente uma evolução clínica do processo auto-imune.

Nesse sentido, o papel preditor de doença dos anticorpos não é aplicável à população geral, devido à baixa incidência da AAD e à baixa frequência dos ACA (no máximo até 5%) e

dos anticorpos anti-21OH (no máximo até 0,6%), reduzindo o valor preditivo destes marcadores imunológicos nestes indivíduos (16).

Por essa razão se referiu que os melhores candidatos para determinação do risco de desenvolver AAD através da detecção de anticorpos são aqueles em que já foi diagnosticada outra doença auto-imune órgão-específica (16).

Foram detectados ACA no máximo até 13% e anticorpos anti-21OH no máximo até 5% dos indivíduos com doenças auto-imunes órgão-específicas, como tiroidite de Hashimoto, doença de Graves, diabetes mellitus tipo 1, falência ovárica prematura e vitiligo (16). A falência ovárica prematura foi a que, com maior frequência, apresentou serologias positivas para estes anticorpos (16).

No estudo realizado por Betterle et al (49), a prevalência de ACA em crianças com doenças auto-imunes órgão-específicas, mas sem AAD clinicamente evidente, variou entre 1% (correspondente a crianças com diabetes mellitus tipo 1) e 48% (correspondente a crianças com hipoparatiroidismo).

Num grupo constituído por 18 doentes com AAD, foram detectados anticorpos anti-21OH em 78% dos indivíduos, anti-SCC em 28% e anti-17OH em 11% (30). Apesar da eventual presença desses anticorpos, a abordagem clínica de outras endocrinopatias auto-imunes (tiroidite de Hashimoto, doença de Graves, diabetes mellitus tipo 1 e falência ovárica prematura) implica a investigação de estádios subclínicos de AAD através da detecção de anticorpos anti-21OH (30).

Por conseguinte, além de permitirem classificar a doença de Addison quanto à sua etiologia – auto-imune e não auto-imune – os ACA e anticorpos anti-21OH permitem a identificação de sujeitos em alto risco de desenvolverem AAD.

Foi sugerido que doentes com ACA e/ou anticorpos anti-21OH sem AAD clínica realizassem testes funcionais (determinação dos níveis séricos de ACTH, teste de estimulação

com ACTH) anualmente (30). Mais precisamente, recomendou-se uma avaliação a cada 6-12 meses para doentes de alto risco e a cada 24-36 meses para doentes de baixo risco (13). A distinção entre indivíduos de alto e baixo risco é definida pela presença de factores clínicos (idade, género, presença de outras doenças), imunológicos (títulos de auto-anticorpos) e funcionais (teste de estimulação de ACTH) (13). Assim, pode-se minimizar o risco de ocorrer uma crise suprarrenal aguda, ao instituir precocemente terapia de substituição, isto é, no início do primeiro estágio de disfunção suprarrenal (13, 16, 30, 48).

b) StCA e outros anticorpos

Os StCA são anticorpos reactivos contra células produtoras de esteróides, como as células de Leydig dos testículos, as células da teca do ovário e sinciotrofoblastos da placenta, além das células adrenocorticais (3, 10, 16, 30). Os anticorpos anti-17OH e anti-SCC são os principais componentes dos StCA. São dirigidos a enzimas que, além de serem expressas no córtex suprarrenal, também o são nas gónadas. Os StCA podem ser detectados na ausência de anticorpos anti-17OH e anti-SCC, o que indica que há auto-antígenos adicionais alvo dos StCA (16) (Quadro 1).

Os StCA são anticorpos da classe IgG (2), sendo a subclasse IgG1 a predominante entre os anticorpos anti-SCC (16, 52, 57).

Dada a sua reactividade contra as células gonadais, os StCA estão associados a hipogonadismo primário, nomeadamente falência ovárica prematura nas mulheres com AAD (3, 10, 12, 16, 30). A sensibilidade destes anticorpos nessas mulheres vai até 80% (16). Em homens, os StCA são também marcadores de insuficiência gonadal, embora a sua sensibilidade seja menor. Este facto pode estar relacionado com a existência da barreira hemato-testicular que pode impedir o contacto dos anticorpos com as células testiculares (3, 16, 30).

Cerca de 2% dos indivíduos saudáveis podem ter StCA (30). Por sua vez, estes estão presentes em 25% dos doentes com AAD (16).

A prevalência dos StCA varia consoante as diferentes formas de AAD. Na APS tipo 1 pode ir até 80%, na APS tipo 2 até 40%, sendo cerca de 18% na AAD isolada. Estas variações podem reflectir as diferenças de frequência da falência gonadal nas diferentes apresentações de AAD (3). Nas APS tipo 2 e 4, o hipogonadismo primário auto-imune normalmente ocorre antes da AAD. Na APS tipo 1 ocorre depois (3, 18, 19).

Foram detectados StCA em até 43% dos doentes com AAD sem hipogonadismo primário (3). Mais precisamente, 43% dos doentes com APS tipo 1, 18% com APS tipo 2 e 11% com AAD isolada tinham StCA, mas não hipogonadismo primário (58).

A presença de anticorpos anti-21OH, anti-17OH e anti-SCC indica a etiologia auto-imune do hipogonadismo primário (52, 59, 60). Nesta apresentação clínica, os anticorpos anti-21OH são os mais sensíveis. Normalmente, na sua ausência, os anticorpos anti-17OH e anti-SCC também não são detectados (60). Na prática, não é possível classificar uma insuficiência ovárica auto-imune, na ausência de anticorpos anti-21OH (59, 60).

Assim, os anticorpos contra as enzimas 17OH e SCC são mais frequentes em doentes com APS do tipo 1, ou em mulheres com insuficiência suprarrenal e ooforite auto-imune (12, 52). Os anti-17OH e anti-SCC são detectados em cerca de 40 a 70% dos casos de APS tipo 1, sendo os últimos ligeiramente mais frequentes (16). No entanto, os anticorpos mais frequentes nesta síndrome são os anti-21OH (16).

Os anticorpos anti-17OH e anti-SCC não são os únicos anticorpos do grupo dos StCA (embora sejam os mais importantes), uma vez que estes podem ser detectados na ausência daqueles (16, 48). Contudo, não foram detectados anticorpos contra outras enzimas envolvidas na síntese de corticosteróides, como 3- α -hidroxiesteroide desidrogenase, 11- α -hidroxilase, aromatase ou adrenodoxina, em doentes com AAD (3, 16).

c) Papel dos auto-anticorpos na patogénese da AAD

Embora a detecção dos auto-anticorpos seja útil para a classificação etiológica da insuficiência suprarrenal primária e para a identificação de sujeitos com alto risco de desenvolver AAD, estes parecem contribuir pouco para a sua patogénese: foram detectados anticorpos anti-21OH em 0,5 a 1% de indivíduos saudáveis, não tendo estes desenvolvido insuficiência suprarrenal evidente (3); a passagem transplacentar de auto-anticorpos de mães com AAD, não provoca AAD nos seus recém-nascidos (61); e os anticorpos anti-21OH inibem a actividade enzimática da 21OH *in vitro*, mas tal não ocorre *in vivo* (50).

No entanto, foi sugerido que as células B auto-reactivas para a enzima 21OH podem actuar como células apresentadoras de antígenos no estímulo de respostas imunes mediadas por células T. Do mesmo modo, na presença de anticorpos anti-21OH, pode ocorrer um aumento de IFN- γ , sugerindo uma relação sinérgica entre os auto-anticorpos e um ou mais subconjuntos de células apresentadoras de antígenos (10).

Os anticorpos anti-21OH são da subclasse IgG1 (16, 52, 57), o que implica a sua participação em processos destrutivos como activação do complemento ou citotoxicidade celular dependente de anticorpos (10, 52). Em doentes com StCA e AAD, foi demonstrado que estes anticorpos induzem, *in vitro*, citotoxicidade dependente do complemento contra as células da granulosa do ovário (3). Tal facto sugere um papel patogénico desses anticorpos e que provavelmente os anticorpos anti-21OH actuam através de um mecanismo semelhante.

A selecção da subclasse IgG1 envolve uma resposta dos linfócitos TCD4+, nomeadamente Th1, acompanhando o processo auto-imune, independentemente da sua evolução (52, 57). Por outro lado, a síntese selectiva de anticorpos da subclasse IgG4, detectada em alguns doentes, está associada a uma resposta imune do tipo Th2. Não se conseguiu distinguir, até ao momento, se este subgrupo representa indivíduos com

mecanismos de resposta imune diferente, ou se tal fenómeno indica um estágio diferente da história natural do processo imune.

Nesse sentido, os linfócitos T devem ser as células mais importantes na mediação do processo de destruição auto-imune (3, 10-12, 33, 44).

4. Imunidade celular: papel das células T e citocinas na patogénese da AAD

Já tem vindo a ser referido que as células T desempenham um papel importante na patogénese da AAD (3, 10-12, 44). Em doentes com AAD, foram detectadas respostas proliferativas de células T, com respectiva secreção de IFN- γ , auto-reactivas a epítomos da enzima 21OH (33, 51). Conclui-se, pois, que as respostas das células T reactivas à 21OH constituem novos biomarcadores da AAD. Apesar disso, Rottembourg et al (33) questionaram se haveria associação entre o tempo após diagnóstico e a reactividade auto-imune, pois 10 dos 11 doentes analisados com menos de 5 anos de doença apresentaram respostas celulares, em comparação com apenas 2 em 5 doentes com 5 ou mais anos de doença.

Anteriormente a estes estudos, já em 1992 se tinham identificado respostas celulares T a uma fracção proteica suprarrenal de 18 a 24 kDa (62).

Vendrame et al (63) verificaram uma diminuição da expressão da caspase 3, envolvida na apoptose das células T, em doentes com APS do tipo 2. Kriegel et al (64) detectaram uma diminuição da supressão exercida pelas células T reguladoras CD4+CD25+, também em doentes com APS do tipo 2.

a) Auto-reactividade celular

Na fase de perpetuação do processo auto-imune pressuposta por Bratland et al (10) ocorre a activação de células T e células B auto-reactivas nos nódulos linfáticos locais. A proliferação de células T auto-reactivas é determinada pelo timo (processo de tolerância

imunitária central) e na periferia (tolerância imunitária periférica). Está também relacionada com a susceptibilidade genética de cada indivíduo. Além disso, a resposta auto-imune depende de células T circulantes com receptores capazes de reconhecer antígenos apresentados pelas células dendríticas.

Como já se referiu, o processo de tolerância imunitária central é regulado pelo gene AIRE, localizado no cromossoma 21. Na APS tipo 1 ocorrem mutações neste gene (2- 4, 6, 10-12, 18). Durante o processo de tolerância imunitária central, grande parte dos auto-antígenos são expressos nas células epiteliais do timo, de modo a eliminar precursores de linfócitos T com receptores específicos para esses auto-antígenos (39).

No entanto, algumas células auto-reactivas escapam ao processo de eliminação do timo. É nesta fase que o processo de tolerância imunitária periférica é importante. Mecanismos adicionais regulam a actividade dos linfócitos, ao nível dos órgãos linfáticos periféricos. Entre eles, destaca-se a supressão activa de respostas imunes por células T reguladoras, que podem ser naturais ou induzidas: as naturais são produzidas no timo durante o desenvolvimento das células T e constituem cerca de 5 a 10% dos linfócitos T CD4+; as induzidas desenvolvem-se a partir de precursores de células T “naive” nos órgãos linfáticos periféricos após a exposição dos auto-antígenos (39). Assim, é possível perceber que defeitos nas acções das células T reguladoras podem despoletar processos auto-imunes, como Kriegel et al (64) verificaram em doentes com APS tipo 2.

Para que o processo auto-imune evolua para doença, é necessária a activação das células Th, que depois induzem a proliferação de células T citotóxicas e de células B auto-reactivas, com produção de anticorpos, como já se referiu (10). O subtipo mais frequente dos anticorpos anti-21OH é o IgG1, o que implica a activação de células T CD4+ (16, 52, 57). A AAD resulta assim de uma inflamação auto-imune destrutiva mediada por células T, com desequilíbrio nas respostas imunes Th1 e Th2. No entanto, a selecção prevalente do subtipo

IgG1, reflecte a necessidade de uma resposta de anticorpos dependente de células Th1 (52). Níveis elevados de citocinas como CXCL-10 (ou IP-10) e de MIP1- α , específicas de células Th1, e MIP1- β , específicas de células Th2, foram detectados em doentes com AAD (65). Além disso, dentro do grupo estudado, os doentes com curta duração de doença (até 5 anos) tinham níveis superiores de MIP1- β , em relação aos doentes com longa duração de doença (6 a 18 anos). Este facto pode indicar o envolvimento prevalente das células Th1, em detrimento das Th2, na AAD de longa duração. Um outro subconjunto de células Th, as células Th17, parece ter importância na fase inicial do processo de patogénese das doenças auto-imunes, ao facilitar a migração das células Th1 para o tecido alvo, que devem actuar numa fase mais tardia (10, 66, 67).

A activação das células B e T auto-activas dos nódulos linfáticos pelas células dendríticas vai ser também acompanhada por uma proliferação de células B e T de memória, reactivas para a 21OH. Assim, a activação da resposta auto-imune torna-se autónoma, pois já não é necessária a acção das células dendríticas para a evolução do processo (10).

b) Desencadeantes da auto-actividade celular: epítomos imunodominantes

No estudo de Husebye et al (44), onde se verificou que as células T dos ratinhos imunizados proliferavam em resposta a peptídeos da 21OH, foram usados anticorpos contra células T CD4+ e CD8+, para verificar qual destas classes mediava a resposta proliferativa. Os anticorpos anti-CD4+ inibiram a resposta proliferativa, enquanto que os anticorpos anti-CD8+ tiveram apenas efeitos negligenciáveis. A resposta proliferativa estrita a células T CD4+ relaciona-se com a apresentação de antígenos ligados a moléculas MHC classe II. Isto vem de encontro ao facto de o peptídeo constituído pelos aminoácidos 342-361 da 21OH, identificado como imunodominante nesse estudo e no estudo de Bratland et al (51), ter tendência a ligar-se a moléculas HLA-DR4 (HLA classe II). Embora a função principal das

moléculas classe II seja apresentar peptídeos de antígenos exógenos e sendo a 21OH intracelular, vários tipos de células podem apresentar antígenos citoplasmáticos através do MHC classe II, como as células B e as células dendríticas (44). Além disso, na fase activa do processo imune as células adrenocorticais aumentam a expressão de moléculas MHC classe II (12, 35).

Enquanto que estes autores sugeriram o papel preferencial das células T CD4+, devido à expressão de moléculas MHC classe II e aos alelos de susceptibilidade HLA classe II, o estudo de Rottembourg et al (33) identificou epítomos (nomeadamente o peptídeo 431-450) restritos aos haplótipos HLA-B*0801 e HLA-B*3501 (HLA da classe I), que induziram respostas celulares T CD8+.

c) Consequência da auto-reatividade celular: destruição adrenocortical

A destruição do córtex suprarrenal está dependente, como já se referiu, do sistema de complemento, do efeito citotóxico de citocinas e das células T citotóxicas (10). O IFN- γ deve ser uma das citocinas com maior importância no desenvolvimento do processo auto-imune. Nos estudos já citados, foi possível verificar o seu aumento após estimulação de células T com peptídeos da 21OH (33, 44, 51). O IFN- γ , produzido por células T CD4+ e células T citotóxicas, promove um aumento de expressão de moléculas MHC classe II nas células adrenocorticais (35). Além disso, as células adrenocorticais, ao expressarem MHC classe II, vão estimular mais células T, que vão produzir mais IFN- γ , induzindo ainda mais a expressão de MHC classe II. Deste modo, o IFN- γ pode não só ampliar a actividade das células dendríticas na fase de iniciação proposta por Bratland et al (10), mas também contribuir para um ciclo vicioso articulado entre a activação de células T e a expressão de MHC classe II. O IFN- γ pode também induzir a produção de outras citocinas inflamatórias – como a IP-10, o TNF- α e a IL-1 β – por macrófagos, linfócitos e pelas células adrenocorticais. Por sua vez, as

citocinas libertadas recrutam mais células inflamatórias, contribuindo para o aumento do infiltrado mononuclear do tecido suprarrenal (10, 35). Há assim um ciclo de perpetuação inflamatória local que leva à destruição do córtex suprarrenal.

5. Susceptibilidade genética na AAD

Como já se referiu, a evolução do processo auto-imune decorre da activação de células B e T auto-reactivas. Foi considerado que essa activação dependeria da tolerância imunitária central e periférica, bem como do genótipo de cada indivíduo (10).

a) AAD associada à APS tipo 1

A APS tipo 1 é causada por mutações de transmissão autossómica recessiva no gene AIRE, localizado no cromossoma 21 e responsável pela regulação do processo de tolerância imunitária central (2-4, 6, 10-12, 18).

b) AAD não associada à APS tipo 1

Acredita-se que toda a AAD não associada à APS tipo 1 resulta de uma combinação complexa de factores genéticos e ambientais (3, 10, 18, 19). Em termos de factores genéticos, vários alelos HLA (2-4, 6, 10-12, 14, 68-74) contribuem para o processo auto-imune, provavelmente por facilitarem a ligação das moléculas HLA, que codificam, a certos peptídeos derivados de antígenos suprarrenais, ou por modelagem específica das células T a favor da autoimunidade (10). Polimorfismos de outros genes também estão associados à AAD e a outras doenças auto-imunes (6, 10-12). Deste modo, a susceptibilidade genética encontrada em doentes com AAD, também se verifica, por exemplo, na diabetes mellitus tipo 1, em tiroidites auto-imunes e na falência ovárica prematura, que são componentes da APS tipo 2. O processo auto-imune destas doenças, no contexto de APS tipo 2 (e também de APS tipo 4), terá, pois, um fundo genético comum (10, 11, 68-74).

A região MHC, localizada no cromossoma 6, inclui os genes HLA (classe I, II e III) que codificam moléculas de apresentação de antígenos (14, 68, 69) e os genes MIC (“MHC class I chain-related sequence A, B”: MICA, MICB) e CYP21A2 (codifica a 21OH), situados entre os genes HLA classe I e II (entre os genes HLA-DRB1 e HLA-B) (68, 70, 71, 73-75).

Os genes HLA são os que apresentam a maior quantidade de polimorfismos dentro do genoma humano (68), constituindo os determinantes mais importantes do risco de desenvolver AAD não associada à APS tipo 1 (68-70).

Os genes HLA classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) codificam moléculas responsáveis pela apresentação de peptídeos às células TCD8+. Por sua vez, as moléculas codificadas pelos genes HLA classe II (DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1) apresentam os peptídeos às células T CD4+ (14, 69).

Os alelos mais associados à AAD são: HLA-B*08, HLA-DRB1*0301-DQB1*0201, HLA-DRB1*0404-DQB1*0302 e HLA-DRB1*0403-DQB1*0305, bem como o alelo MICA5.1 do gene MICA (10, 11, 14, 68-75).

O quadro do Anexo 2 indica estas variações genéticas de susceptibilidade, referenciando-as no cromossoma 6.

i. Alelos dos genes HLA classe II: loci DRB1, DQA1 e DQB1

Os estudos de Husebye et al (44) e Bratland et al (51), ao sugerirem um papel dominante das células T CD4+ no processo auto-imune, identificaram peptídeos ligados a moléculas HLA-DR4, indiciando a importância do haplótipo HLA DRB1*0404 na susceptibilidade para a AAD.

Skinningsrud et al (68) confirmaram que os haplótipos DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201 (DR3/DQ2) e DRB1*0404-DQA1*0301-DQB1*0302 (DR4.4/DQ8) aumentavam o risco para a AAD, especialmente em combinações heterozigóticas.

Identificaram também o HLA-DRB1 como o *locus* primário de risco, sendo os alelos com maior associação significativa o DRB1*0301 e o DRB1*0404 (68). De facto, no estudo de Baker et al de 2011 (69), o alelo DRB1*0404 foi o mais associado à AAD, enquanto que o DRB1*0401 foi relacionado com a diabetes mellitus tipo 1.

No entanto, um estudo realizado em indivíduos italianos (72), não associou o alelo DRB1*0404 à AAD. Contudo, é importante referir que os alelos DR4 não são frequentes na população italiana (73). Por outro lado, Yu et al (71) sugeriram que a progressão para AAD em indivíduos com anticorpos anti-21OH difere consoante sejam portadores dos alelos DRB1*0401, DRB1*0402 ou DRB1*0404. A diferença de dois e três aminoácidos entre o alelo DRB1*0404 e os alelos DRB1*0401 e DRB1*0402, respectivamente, pode resultar em diferentes influências nas células T, levando a que os últimos previnam ou atrasem a evolução para a AAD e o primeiro aumenta o seu risco.

ii. Alelos dos genes HLA classe I e classe II: haplótipo A1-B8-DR3

O estudo de Baker et al (70), sobre a influência do haplótipo A1-B8-DR3 (HLA-A1, HLA-B8, HLA-DR3) nos processos auto-imunes, sugeriu que a AAD está associada não só aos alelos do *locus* DRB1, mas ao haplótipo que se estende desde esse *locus* até ao HLA-B, não incluindo o HLA-A. Assim, será mais provável que os *loci* de alto risco estejam em “linkage disequilibrium” com os alelos HLA-DR3 e HLA-B8. Deste modo, polimorfismos compreendidos entre os genes HLA-DRB1 e HLA-B podem influenciar o risco de desenvolver AAD, bem como aqueles entre os genes HLA-B e HLA-A, embora em menor extensão que os primeiros. Nesse estudo, cerca de 85% dos indivíduos com AAD de famílias multiplex e 24% dos de famílias simplex eram portadores dos haplótipos DR3/4 juntamente com o B8, em comparação com apenas 1,5% dos controlos.

Rottembourg et al (33) identificaram epítomos indutores de auto-reactividade, restritos a HLA-B8 e HLA-DR3: dos nove doentes que expressavam o haplótipo HLA-DRB1*03, sete também expressavam o haplótipo HLA-B*0801. Pôde-se concluir que estes indivíduos expressavam parte ou a totalidade do haplótipo A1-B8-DR3, que está também associado a várias outras doenças auto-imunes, como diabetes mellitus tipo 1, AAD e doença celíaca.

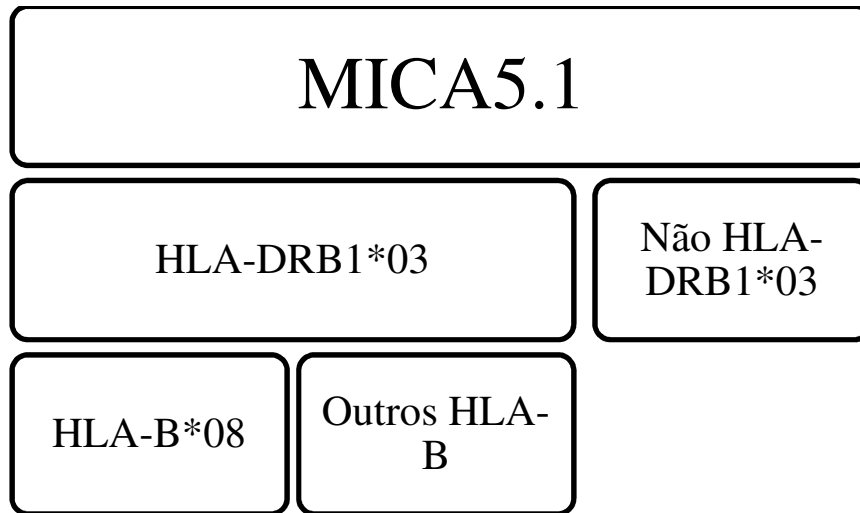
iii. Regiões entre os genes HLA classe I e II: alelos do gene MICA e do microssatélite D6S273

O gene MICA está localizado entre os genes HLA classe I e II, mais precisamente entre os genes HLA-B e BAT-1 (“B-associated transcript”) (68, 73, 75). É expresso por monócitos, queratinócitos e células endoteliais, e pensa-se que codifica proteínas cuja função está relacionada com a apresentação de antígenos e com a interacção entre células T e NK (75).

O polimorfismo do microssatélite do exão 5 do gene MICA consiste em 5 alelos, consoante o número de unidades de repetição GCT (alelos A4, A5, A6 e A9). O alelo A5.1 consiste em 5 repetições GCT com inserção adicional de um nucleotídeo (GGCT) (73, 75).

No estudo de Skinningsrud et al (68), os doentes com haplótipos DRB1*0301, eram também portadores dos alelos B*08 e MICA5.1. No entanto, este também estava presente noutros alelos HLA-B, podendo, assim, influenciar o risco para AAD nos haplótipos DRB1*0301, mesmo na ausência de HLA-B*08. Contudo, o alelo MICA5.1 foi detectado em indivíduos com AAD não portadores de DRB1*0301. As associações entre o alelo MICA 5.1 e outros alelos, indicadas nesse estudo, estão resumidas no Quadro 2.

Por sua vez, o alelo MICA6 teve uma associação negativa com a AAD (73, 75).



Quadro 2. Associações entre o alelo MICA5.1 e outros alelos em doentes com AAD não associada à APS tipo 1. (Referências: 68)

Foi encontrada outra região, em redor do microssatélite D6S273 localizado entre os genes HLA classe I e classe II, associada ao risco de desenvolver AAD. Essa região é provavelmente um componente do haplótipo A1-B8-DR3. Verificou-se que o risco para desenvolver AAD estava aumentado em indivíduos portadores dos genótipos DR3-D6S273*140-MICA5.1 e DRB1*0404-D6S273*134-MICA5.1, tendo-se sugerido que a influência dos alelos D6S273 poderia ser independente da dos alelos dos genes HLA-DR e MICA (75).

iv. Alelos com associação negativa para a AAD: protectores de progressão?

Foi demonstrada a presença de alelos HLA com associação negativa para a AAD, nomeadamente: HLA-A2, HLA-B15, DRB1*01, DRB1*0701, DRB1*1301, DRB1*1302, DQB1*0501, DQB1*0603, DQB1*0604 (68, 69), DRB1*0401, DRB1*0402 (71), DRB1*0403 (73, 74) e o MICA6 (73, 75).

Ao terem uma associação negativa com a AAD, estes alelos poderiam conferir protecção contra o seu desenvolvimento.

No estudo de follow-up de Baker et al (69), em indivíduos com anticorpos anti-21OH, nenhum dos portadores do alelo HLA-B15 progrediu para AAD, em contraste com 25% dos não portadores desse alelo. Concluiu-se que o alelo HLA-B15 poderia prevenir a progressão para AAD em indivíduos com auto-anticorpos, não protegendo, no entanto, contra a formação desses anticorpos.

Em relação aos restantes alelos de associação negativa, ainda não foi comprovado o seu papel protector para a AAD.

v. Outros genes de susceptibilidade

Foram identificadas outras variações genéticas de susceptibilidade não associadas às regiões MHC, nomeadamente a nível dos genes envolvidos no metabolismo da vitamina D, do CTLA-4 (“cytototoxic T lymphocyte antigen-4”), do transactivador do MHC classe II (“MHC class II transactivator” – CIITA), do CLEC16A (“C-type lectin domain family 16, member A”), do PTPN22 (“tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 22”), do PD-L1 (“programmed death ligand 1”), da NALP1 (“NACHT leucine rich repeats protein 1”), entre outros recentemente identificados (6, 10-12, 76-92). A tabela do Anexo 3 resume as características dos genes de susceptibilidade referidos nesta secção.

A vitamina D tem propriedades imunomoduladoras importantes, sendo as suas acções mediadas pelo seu receptor, codificado por um gene localizado no cromossoma 12q12-14. A vitamina D diminui a expressão das moléculas HLA classe II nas células endócrinas e inibe a proliferação das células T e a secreção de citocinas (76, 77). No estudo de Pani et al (76), foi investigado o papel de polimorfismos Fok1, Bsm I, Apa I e Taq I do gene do receptor da vitamina D na AAD. Os genótipos “ff” e “tt” revelaram-se os mais associados à AAD. Foi também sugerida uma interacção entre os haplótipos HLA-DQ2/DQ8 e o genótipo “tt”. Os

polimorfismos identificados devem alterar as funções do receptor da vitamina D, a sua afinidade ou a sua transcrição.

O gene CYP27B1, localizado no cromossoma 12, codifica a enzima 1- α -hydroxylase, responsável pela síntese da forma activa da vitamina D. Os polimorfismos situados na sua região promotora (-1260C, -1918, -1077) parecem ter um efeito mais significativo na patogénese da AAD que os do gene do seu receptor. A sua presença pode levar a variações na função da vitamina D, como a regulação das células T, contribuindo para a autoimunidade (11, 77).

O gene CTLA-4, localizado no cromossoma 2q33, codifica a molécula CTLA-4, da superfamília das imunoglobulinas, que regula a resposta das células T, diminuindo-a (78-80). Sugeriu-se que certos polimorfismos deste gene, ao influenciarem os níveis da molécula CTLA-4 circulante (78, 80), aumentavam o risco para desenvolver AAD, nomeadamente: repetições do dinucleotídeo AT (ATn) no exão 3 e o polimorfismo CTLA4+49 (codão 17 – alanina ou Ala17) do exão 1 (78-81). Os estudos sobre estes polimorfismos são contraditórios. Em dois estudos (78, 79) o polimorfismo correspondente às repetições AT no exão 3 foi considerado mais importante que o CTLA4+49. Contudo, o estudo de Brozzetti et al (80) demonstrou que o CTLA4+49 estava significativamente associado à AAD, em detrimento das repetições AT.

O gene CIITA (ou MHC2TA), situado no cromossoma 16p13, é responsável pela regulação da expressão das moléculas HLA classe II. Algumas variações deste gene foram associadas a um risco aumentado de desenvolver AAD, tais como polimorfismos confinados a um único nucleótido (“single nucleotide polymorphisms” – SNPs): o rs3087456 (MHC2TA-168 A→G, polimorfismo da região promotora) e o rs8048002 (82, 83). O SNP rs8048002 parece ter uma associação maior com a doença que o rs3087456 (83). Estes polimorfismos não estão dependentes da presença de outros alelos HLA, mas podem alterar a expressão das

moléculas HLA classe II ou a sua selectividade para os tecidos, induzindo o processo auto-imune (82, 83).

O gene CLEC16A, também localizado no cromossoma 16p13, codifica uma proteína (lectina tipo C) presente em células dendríticas, linfócitos B e células NK. Embora a sua função seja ainda desconhecida, julga-se que, por ser uma lectina, esteja envolvida na distinção entre antígenos próprios e antígenos estranhos ao organismo. Um SNP deste gene, o rs12917716, foi associado à AAD. Pensa-se que o efeito deste SNP é independente dos SNPs do CIITA, bem como dos alelos HLA (83).

O gene PTPN22, situado no cromossoma 1p13.3-13.1, codifica a tirosina fosfatase linfóide (“lymphoid tyrosine phosphatase” – LYP) que modula a activação das células T, por inibir as vias de sinalização dependentes dos seus receptores (84-86). O alelo 1858T foi confirmado como factor de risco para várias doenças auto-imunes, entre elas a AAD (84, 85). Este alelo, que ocorre no nucleotídeo 1858 (C→T) resulta na substituição de um resíduo arginina por um de triptofano no codão 620 (84-86) e tem um efeito dominante *in vitro* (84, 86). Assim, indivíduos heterozigóticos (os mais frequentes) têm um risco aumentando para desenvolverem autoimunidade, mas menor que os homozigóticos (84, 86). Esta variante alélica vai resultar num ganho de função da enzima LYP (84-86), que pode levar a uma diminuição da eliminação dos linfócitos T autoreactivos no timo (84). Outras mutações raras nesse gene podem predispor para a AAD, embora o seu efeito na função da LYP ainda não seja bem conhecido (11, 85).

Variações no gene PD-L1 (cromossoma 9p24) são potenciais condicionantes de autoimunidade, devido ao papel deste na tolerância imunitária periférica, ao regular a função das células T e a produção de citocinas (87).

A proteína NALP1 ou NLRP1 (“NLR family, pyrin domain containing 1”) faz parte da família NLR (NOD – “nucleotide oligomerization domain” – “like receptors”), que

corresponde a um grupo de receptores citoplasmáticos envolvidos na imunidade inata (88, 89). A NLRP1 é expressa por células T e células de Langerhans e interage com as caspases 1 e 5, formando um complexo inflamatório promotor da maturação de algumas interleucinas. Interage também com as caspases 2 e 9, intervindo no processo apoptótico. Quatro SNPs do gene NLRP1 (cromossoma 17p13) foram associados à AAD: rs12150220, rs6502867, rs2670660 e rs878329, no entanto o primeiro parece ser o mais importante (88, 89). Magitta et al (88) identificaram o alelo *major* deste SNP como o que conferia maior risco, enquanto que Zurawek et al (89) o atribuíram ao alelo *minor* A.

Mais recentemente foram identificadas outras variações genéticas associadas à AAD, nomeadamente ao nível dos genes UGT2B28, ADAM3A e CD226 (90-92).

A presença de “copy number variations” (CNVs) nos genes UGT2B28 (codifica a uridina-difosfato-glucuronosil-transferase família 2, polipeptídeo B28) e ADAM3A (codifica desintegrina e metaloproteinase domínio 3A) pode aumentar a susceptibilidade para a autoimunidade, provavelmente por alterações na inativação esteróide e na maturação de células T, respectivamente (90).

O gene da molécula co-estimuladora de células T, a CD226, pode albergar variações que aumentem o risco para doenças auto-imunes, como o alelo codificante de serina na posição 307 (CD226 307*Ser) (91, 92).

As variações genéticas referidas nesta secção, tais como as variações alélicas dos genes HLA, são também encontradas noutras doenças auto-imunes. Acredita-se que as variações nos genes do receptor da vitamina D e do CTLA-4 estejam relacionadas com os haplótipos HLA, modulando o risco por eles conferido (76-81).

IV. Discussão e Conclusão

A doença de Addison, caracterizada pelo défice de produção de corticosteróides, é uma patologia rara. Embora o seu diagnóstico seja relativamente fácil, este é atrasado pela clínica pouco específica e insidiosa. O seu tratamento passa pela terapia de substituição, que não se tem revelado tão adequada como se desejaria, pois não segue o padrão fisiológico de secreção do cortisol (8, 9). A causa mais frequente desta patologia é a destruição auto-imune do córtex suprarrenal. Deste modo, o conhecimento detalhado da patogénese da AAD poderá levar ao desenvolvimento de novas metodologias de detecção precoce e prevenção, bem como, eventualmente, a novas terapias, com destaque para a imunoterapia e para a terapia génica.

As hipóteses geradas em torno da imunopatologia e da genética da AAD têm sido baseadas nos processos patogénicos já conhecidos de outras doenças auto-imunes, motivando a dificuldade de comprovação de algumas delas, porventura devido à falta de modelos animais de autoimunidade suprarrenal bem definidos (3, 10, 11). Outro obstáculo relaciona-se com a dificuldade em obter tecido suprarrenal humano, devido à posição anatómica das glândulas, impedindo o estudo do infiltrado mononuclear em indivíduos com diagnóstico recente de AAD (3, 10, 11).

Apesar destes obstáculos, os conhecimentos sobre a patogénese da AAD, têm evoluído significativamente e permitiram sugerir como biomarcadores da AAD, não só os ACA e os anticorpos anti-21OH, mas também as células T auto-reactivas à 21OH, as citocinas (como o IFN- γ e a IP-10) e as interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-17A). Estas funcionam quer como marcadores das respostas proliferativas das células T, quer como participantes activos em todo um ciclo de activação celular imuno-mediada.

Os anticorpos anti-21OH são bons preditores de desenvolvimento de AAD e, portanto, os mais indicados na detecção dos seus estádios subclínicos (13, 30). Contudo, a

determinação destes anticorpos não é aplicável à população geral, mas apenas a indivíduos diagnosticados com outras doenças auto-imunes órgão-específicas (16, 55, 56), pelo facto de a AAD estar geralmente associada a APS, particularmente a APS tipo 2 (em cerca de 50 a 60% dos casos) (16).

Assim, os anticorpos anti-21OH não são preditores absolutos, sendo a progressão para doença muito variável (3, 13); têm maior valor se associados às variações genéticas de susceptibilidade para a AAD isolada ou associada a APS (3, 10, 11).

Os polimorfismos compreendidos entre os genes HLA-DRB1 e HLA-B são os mais associados à AAD (excluindo a AAD integrada na APS tipo 1) (2, 4, 6, 10-12, 14, 68-72). Nesse sentido, em indivíduos com anticorpos anti-21OH, as variações na progressão para a AAD podem estar relacionadas com as variações da frequência dos diferentes alelos e polimorfismos genéticos nas populações [por exemplo: os alelos HLA-DR4 não são frequentes na população italiana (73); a frequência do alelo 1858T do gene PTPN22 está aumentada em indivíduos controlo de populações do norte da Europa – é tanto maior, quanto mais a norte for a origem da população (84)].

Por outro lado, vários alelos foram considerados protectores, nomeadamente o alelo HLA-B15, que, apesar de prevenir a progressão da doença, não previne a formação de auto-anticorpos (69).

As variações na progressão para AAD clínica, são evidentes quando se comparam adultos e crianças (48, 49). Em adultos, esta progressão foi mais frequente em indivíduos com insuficiência suprarrenal sub-clínica prévia, com títulos elevados de anticorpos e portadores do haplótipo HLA-DR3 (48). Em crianças, o desenvolvimento de AAD clínica não se relacionou com os títulos de anticorpos, função suprarrenal prévia, presença de outras doenças auto-imunes ou haplótipos HLA-DR (49).

Esta diferença pode ser devida não só a variações nas respostas celulares auto-ímmunes (49), mas também ao facto de, nas crianças, a forma de AAD mais frequente ser associada à APS tipo 1 (3, 6, 18, 19) e motivada por defeitos na tolerância imunitária central (2, 4-6, 10-12, 18), condicionando um processo de destruição mais agressivo, mais generalizados e mais amplo.

A distinção entre indivíduos de alto e baixo risco é definida essencialmente pela presença de factores clínicos (idade, género, presença de outras doenças) e imunológicos (títulos de auto-anticorpos). Deste modo, foi recomendada uma avaliação clínica para doentes de alto risco a cada 6-12 meses (13)

Vários estudos recomendaram a terapia de substituição precoce para indivíduos portadores de anticorpos, de genes de susceptibilidade e com insuficiência suprarrenal sub-clínica (3, 13, 16, 30, 48), tendente não só a minimizar o risco de ocorrência de episódios de insuficiência suprarrenal aguda, mas também eventualmente a impedir a evolução para estádios irreversíveis que conduzam à clinica da AAD (3, 13, 16). Contudo, é ainda necessário comprovar os efeitos benéficos desta prática, uma vez que parece existir um aumento da morbidade com a actual terapia de substituição, dado não conseguir restaurar o ciclo fisiológico dos níveis das hormonas corticosteróides (8, 9).

Assim, tem sido reforçada a necessidade de continuar a estudar os processos imunopatológicos envolvidos na destruição suprarrenal, de modo a identificar novos biomarcadores de risco de progressão para doença, que permitam desenvolver novas terapêuticas (imunoterapia e terapia génica).

Os anticorpos anti-21OH, embora permitam identificar a autoimunidade como causa da doença de Addison e determinar uma estimativa do risco de desenvolver AAD, não parecem estar directamente envolvidos na destruição das suprarrenais. Além disso, a sua utilidade enquanto preditores de risco é relativa e só aplicável em determinadas situações.

Não obstante, verificou-se que os anticorpos podem estimular a libertação de IFN- γ (10), citocina importante no processo auto-imune. O facto de a subclasse predominante ser a IgG1, indica a participação dos anticorpos nos processos destrutivos dependentes da activação do complemento (10, 52). A subclasse IgG1 também implica respostas celulares Th1 (52), facilitadas pelas células Th2 e Th17 (10, 65, 67).

As células T auto-reactivas parecem ser os efectores mais importantes no processo de destruição auto-imune das suprarrenais (3, 10-12, 33, 44, 51) e, portanto, podem ser consideradas marcadores de doença. Seria particularmente útil a identificação de respostas proliferativas de células T a epítomos específicos da 21OH, de modo a uma caracterização completa destas. Os estudos consultados identificaram dois epítomos indutores de respostas proliferativas de células T, evidenciadas pela detecção de IFN- γ . O epítomo constituído pelos aminoácidos das posições 342 a 361 induziu a proliferação de células T CD4+ auto-reactivas em indivíduos com o haplótipo HLA-DRB1*0404 (51). Por outro lado, o epítomo 431-450 determinou respostas celulares T CD8+ em indivíduos com os haplótipos HLA-B*0801 e HLA-B*3501 (33). As diferenças referidas permitem concluir que provavelmente existam vários epítomos indutores de auto-reactividade. As variações nos epítomos devem estar dependentes das variações nos alelos HLA. Logo, a frequência de determinado alelo HLA deverá determinar a dominância de respostas celulares T CD4+ ou CD8+. Como os vários alelos HLA estão em “linkage disequilibrium” entre si, a presença de um pode condicionar a de outro. Além disso, a maioria dos alelos associados à AAD encontra-se na região delimitada entre os genes HLA-B e HLA-DRB1 (2, 4, 6, 10-12, 14, 68-72). Nessa lógica, os vários polimorfismos compreendidos nessa zona vão influenciar respostas das células T CD4+ e CD8+, podendo também haver uma resposta dominante de uma delas, se os alelos presentes forem maioritariamente de genes HLA classe II ou I, respectivamente. Deste modo, uma grande variedade de epítomos poderia funcionar como marcador de doença. São, pois,

necessários mais estudos que detectem epítomos realmente imunodominantes, permitindo confinar este vasto leque a um pequeno grupo com maior sensibilidade e especificidade na detecção de respostas celulares auto-reactivas.

Estes potenciais marcadores só deverão ser aplicados a indivíduos com risco de desenvolver AAD não associada a APS tipo 1. O processo de destruição nesta síndrome, embora semelhante, depende de um mecanismo precursor inicial completamente diferente e independente de genes de susceptibilidade que não o AIRE.

Nos estudos consultados (33, 51), a detecção das respostas proliferativas das células T auto-reactivas foi determinada pela medição dos níveis de IFN- γ . Nessa lógica, o IFN- γ e outras citocinas são, de certo modo, marcadores do processo auto-imune. O IFN- γ pode também induzir a libertação de outras citocinas inflamatórias, nomeadamente a IP-10, o TNF- α e a IL-1 β , por células do sistema imunitário e também pelas células adrenocorticais. As citocinas libertadas vão activar mais respostas celulares, com libertação de mais citocinas, o que contribui para a formação de um microambiente inflamatório, que conduz à destruição do córtex suprarrenal (10, 34, 35).

É necessário efectuar mais estudos sobre o papel das citocinas na autoimunidade, de modo a identificar as mais envolvidas no processo e a correlacioná-las com as células efectoras. Por exemplo, a IP-10 poderá constituir um marcador das respostas celulares Th1; ainda assim, também é secretada por células adrenocorticais, evidenciando uma pluralidade de respostas celulares que necessitam de ser esclarecidas.

Em conclusão, embora já se tenha um vasto conhecimento sobre os mecanismos que levam à destruição auto-imune das glândulas suprarrenais, este não está consolidado, pois ainda falta responder a muitas questões. É necessário criar modelos animais de AAD, tão bem definidos como os de outras doenças auto-ímmunes órgão-específicas já estudadas. Se estes por si só já permitiram extrapolar algum do conhecimento sobre essas doenças para a AAD,

modelos específicos desta deverão permitir muito mais. Além disso, a análise de indivíduos com AAD, através da determinação de respostas celulares, ainda que periféricamente, assume grande relevância no conhecimento detalhado da patogénese do processo auto-imune. Tais estudos poderão conduzir à descoberta de novas metodologias de detecção precoce e prevenção da progressão para doença, bem como de terapias aplicadas à imunopatologia e genética.

V. Anexo 1

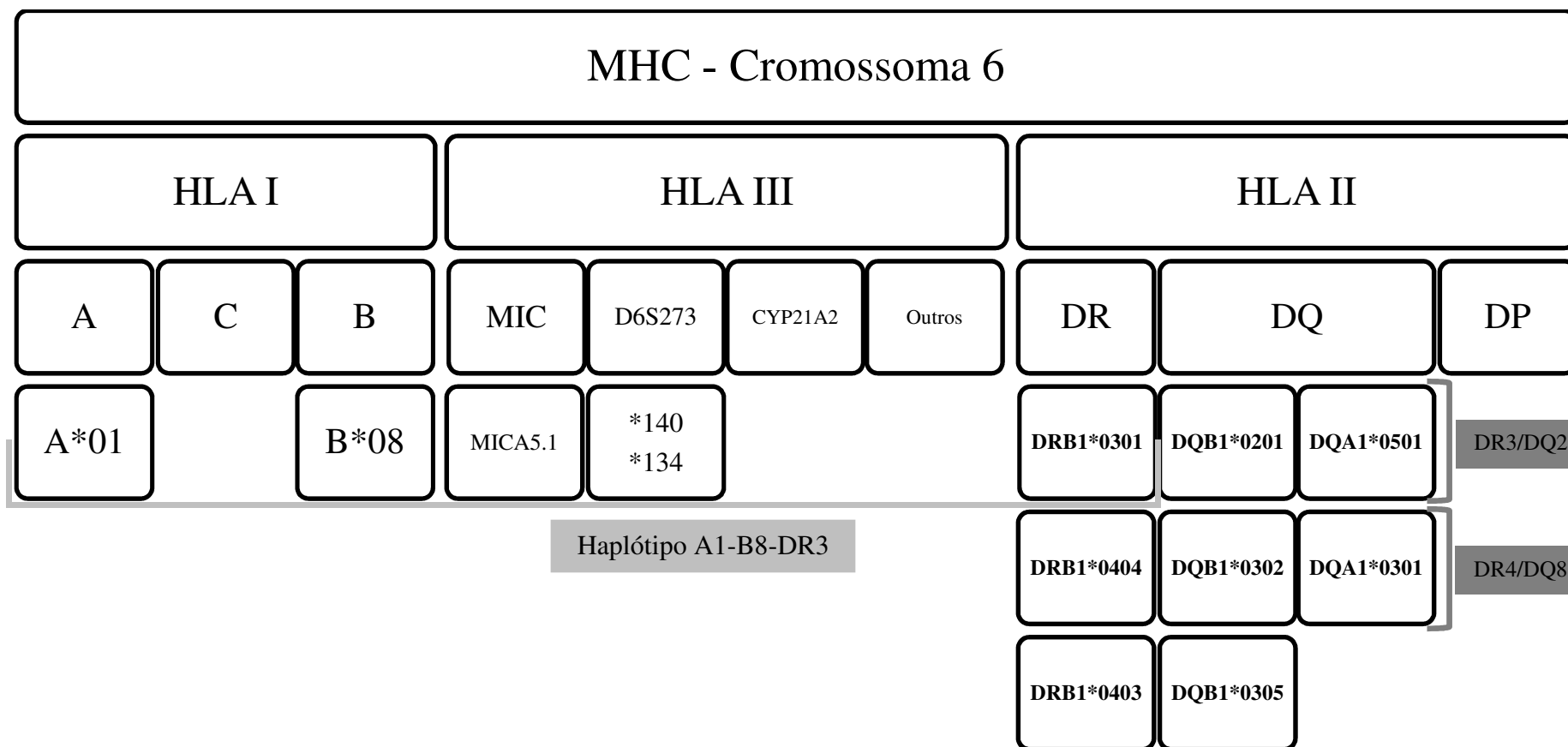
Critérios de diagnóstico das APS tipo 1, 2, 3 e 4. Manifestações *minor* das APS tipo 1 e 2.

	APS tipo 1	APS tipo 2	APS tipo 3	APS tipo 4
Manifestações clínicas <i>major</i> – critérios de diagnóstico	<i>Pelos menos dois:</i> Candidíase mucocutânea crónica, hipoparatiroidismo crónico, doença de Addison	Doença de Addison (<i>sempre presente</i>) + patologia tiroideia auto-imune e/ou diabetes mellitus tipo 1	Patologia tiroideia auto-imune + outras doenças auto-ímmunes (<i>excepto</i> doença de Addison e/ou hipoparatiroidismo) + outras doenças inespecíficas (doenças do colagénio, vasculites)	Combinações não incluídas nos APS tipo 1, 2 e 3
Manifestações clínicas <i>minor</i>	<p><i>Endocrinopatias</i> (hipogonadismo hipergonadotrófico, patologia tiroideia auto-imune, diabetes mellitus tipo 1, hipofisite linfocítica)</p> <p><i>Doenças auto-ímmunes do tracto gastro-intestinal</i> (gastrite crónica atrofica, anemia perniciosa, doença celíaca)</p> <p>Mal-absorção</p> <p><i>Doenças auto-ímmunes hepáticas</i> (hepatite auto-imune e coledocolitíase)</p> <p><i>Doenças auto-ímmunes da pele</i> (vitiligo e alopecia areata)</p> <p>Síndrome Sjögren</p> <p>Artrite reumatóide</p> <p>Distrofia ectodérmica</p> <p><i>Alterações imunológicas</i> (deficiência IgA, hipergamaglobulinémia policlonal)</p> <p>Asplenia</p> <p>Neoplasias malignas</p> <p>Calcificação dos núcleos da base, membrana timpânica, cataratas sublenticulares</p> <p>Vasculite</p> <p>Nefrocalcinose</p> <p>Asplenia, hiposplenismo</p> <p>Linfagiectasia intestinal primária</p>	<p>Hipogonadismo hipergonadotrófico</p> <p>Vitiligo</p> <p>Alopecia</p> <p>Hepatite auto-imune</p> <p>Gastrite crónica atrofica</p> <p>Anemia perniciosa</p> <p>Adenohipofisite</p> <p>Doença de Crohn</p> <p>Doença celíaca</p> <p>Miastenia gravis</p> <p>Neoplasias</p> <p>Ataxia cerebelosa</p> <p>Cardiomiopatia de Takotsubo</p> <p>Púrpura Trombocitopénica auto-imune</p> <p>Síndrome de Sjögren</p> <p>Artrite Reumatóide</p>		

(Referências: 3, 12, 18, 19, 20-27)

VI. Anexo 2

Alelos de genes localizados na região MHC que aumentam o risco para a AAD não associada à APS tipo 1.



Nota: O gene CYP21A2 (codifica a 21OH) está presente no quadro apenas para o referenciar no cromossoma 6 (6p21.3).
(Referências: 2-4, 6, 10-12, 14, 70-77)

VII. Anexo 3

Características dos genes de susceptibilidade não relacionados com a região

MHC, na AAD não associada à APS tipo 1. (Referências: 6, 10-12, 78-94)

Gene	Cromossoma	Proteína – função	Variações genéticas	Efeito
Gene que codifica o receptor da vitamina D	12q12-14	Receptor da vitamina D – mediação das propriedades imunomoduladoras da vitamina D	Fok I Bsm I Apa I Taq I	Alteração da transcrição, função ou afinidade do receptor da vitamina D
CYP27B1	12q13.1-13.3	1- α -hydroxylase – síntese de calcitriol (forma activa da vitamina D)	-1260C -1918 -1077	Variações na função imunomoduladora da vitamina D
CTLA-4	2q33	CTLA-4 – supressão das respostas celulares T	ATn (exão 3) CTLA4+49 (exão 1)	Alterações dos níveis de CTLA-4 circulante
CIITA (MHC2TA)	16p13	CIITA	rs3087456 rs3087456	Alteração da expressão das moléculas HLA classe II ou da sua selectividade para os tecidos
CLEC16A	16p13	Lectina tipo C – distinção de antígenos próprios e estranhos ao organismo	rs12917716	<i>Ainda não é bem conhecido</i>
PTPN22	1p13	LYP – inibição das vias de sinalização dos receptores das células T, modulando a sua activação	1858T	Ganho de função da LYP
PD-L1	9p24	PD-L1 – tolerância imunitária periférica, (regulação da função das células T e da produção de citocinas)	Várias	<i>Ainda não é bem conhecido</i>
NALP1/ NLRP1	17p13	NALP1/NLRP1 – interacção com caspases e formação de complexos inflamatórios e apoptóticos	rs6502867 rs2670660 rs878329	<i>Ainda não é bem conhecido</i>
UGT2B28	4q13.2	Uridina-difosfato-glucuronosil-transferase	CNV	Alterações na inactivação esteróide
ADAM3A	8p11.23-11.22	Desintegrina e metaloproteinase	CNV	Alterações na maturação das células T
CD226	18q22.3	CD226 – molécula co-estimuladora de células T	CD226 307*Ser	<i>Ainda não é bem conhecido</i>

VIII. Referências

- (1) **Chakera AJ, Vaidya B** 2010 Addison disease in adults: diagnosis and management. *Am J Med* 123:409-413.
- (2) **Cardoso RT, Palma IM** 2009 Insuficiência do Córtex Supra-Renal: Fisiopatologia, diagnóstico e tratamento. *Rev Port End Diab Metab* 1: 77-87
- (3) **Betterle C, Dal Pra C, Mantero F, Zanchetta R** 2002 Autoimmune adrenal insufficiency and autoimmune polyendocrine syndromes: autoantibodies, autoantigens, and their applicability in diagnosis and disease prediction. *Endocr Rev* 23:327-364.
- (4) **Ten S, New M, Maclaren N** 2001 Clinical review 130: Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2909-2922.
- (5) **Alves M, Souto SB, Neves C, Carvalho Braga D, Medina JL** 2008 Protocolo de diagnóstico e tratamento de insuficiência supra-renal aguda. *Rev Port End Diab Metab* 1:23-29.
- (6) **Elias LK, Castro M** 2002 Insuficiência Adrenal Primária de Causa Genética. *Arq Bras Endocrinol Metab* 4:478-489.
- (7) **Erichsen MM, Løvås K, Fougner KJ, Svartberg J, Hauge ER, Bollerslev J, Berg JP, Mella B, Husebye ES** 2009 Normal overall mortality rate in Addison's disease, but young patients are at risk of premature death. *Eur J Endocrinol* 160:233-237.
- (8) **Bergthorsdottir R, Leonsson-Zachrisson M, Odén A, Johannsson G** 2006 Premature mortality in patients with Addison's disease: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4849-4853.
- (9) **Leelarathna L, Breen L, Powrie JK, Thomas SM, Guzder R, McGowan B, Carroll PV** 2010 Comorbidities, management and clinical outcome of auto-immune Addison's disease. *Endocrine* 38:113-117.
- (10) **Bratland E, Husebye ES** 2011 Cellular immunity and immunopathology in autoimmune Addison's disease. *Mol Cell Endocrinol* 336:180-190.
- (11) **Husebye E, Løvås K** 2009 Pathogenesis of primary adrenal insufficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23:147-157.
- (12) **Silva RC, Kater CE** 1998 Doença de Addison de Etiologia Auto-Imune. *Arq Bras Metab* 6:431-443.
- (13) **Coco G, Dal Pra C, Presotto F, Albergoni MP, Canova C, Pedini B, Zanchetta R, Chen S, Furmaniak J, Rees Smith B, Mantero F, Betterle C** 2006 Estimated risk for developing autoimmune Addison's disease in patients with adrenal cortex autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1637-1645.
- (14) **Fernandes AM, Maciel LZ, Foss MC, Donadi EA** 2003 Como Entender a Associação Entre o Sistema HLA e as Doenças Auto-Imunes Endócrinas. *Arq Bras Endocrinol Metab* 5:601-611.
- (15) **Rose NR, Bona C** 1993 Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* 14:426-430.
- (16) **Falorni A, Laureti S, Santeusano F** 2002 Autoantibodies in autoimmune polyendocrine syndrome type II. *Endocrinol Metab Clin N Am* 31: 369-389.
- (17) **Söderbergh A, Winqvist O, Norheim I, Rorsman F, Husebye ES, Dolva O, Karlsson FA, Kämpe O** 1996 Adrenal autoantibodies and organ-specific autoimmunity in Addison disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 45:453-460-
- (18) **Betterle C, Zanchetta R** 2003 Update on autoimmune polyendocrine syndromes (APS). *Acta Biomed* 74:9-33.
- (19) **Betterle C, Dal Pra C, Greggio N, Volpato M, Zanchetta R** 2001 Autoimmunity in isolated Addison's disease and in polyglandular autoimmune diseases type 1, 2 and 4. *Ann Endocrinol (Paris)* 62:193-201.
- (20) **Neufeld M, Blizzard RM** 1980 Polyglandular autoimmune diseases. In: *Symposium on Autoimmune Aspects of Endocrine Disorders*. Pinchera A, Doniach D, Fenzi GF, Baschieri L. (Eds). Academic Press (New York) 1980:357-65.
- (21) **Protic M, Gligorijevic V, Bojic D, Popovic B, Damianovic S, Jojic N** 2012 Autoimmune polyglandular syndrome type 2, alopecia universalis and Crohn's disease. *J Crohns Colitis* Jun 5.
- (22) **Hrubisková K, Jackuliak P, Vanuga P, Pura M, Payer J** 2010 Autoimmune polyendocrine syndrome type 2 associated with autoimmune hypophysitis and coeliac disease. *Vnitr Lek* 56:1169-1176.
- (23) **Manto M, Jissendi P** 2012 Brain imaging in cerebellar ataxia associated with autoimmune polyglandular syndrome type 2. *J Neuroimaging* 22:308-311.
- (24) **Lim T, Murakami H, Hayashi K, Watanabe H, Sasaki H, Muto H, Asano Y, Miyamoto K, Omoto Y, Yamauchi Y, Hirokami M, Tanaka S** 2009 Takotsubo cardiomyopathy associated with autoimmune polyendocrine syndrome II. *J Cardiol* 53:306-310.
- (25) **Pollak U, Bar-Sever Z, Hoffer V, Marcus N, Scheurman O, Garty BZ** 2009 Asplenia and functional hyposplenism in autoimmune polyglandular syndrome type 1. *Eur J Pediatr* 168:233-235.
- (26) **Makharia GK, Tandon N, Stephen Nde J, Gupta SD, Tandon RK** 2007 Primary intestinal lymphangiectasia as a component of autoimmune polyglandular syndrome type I: a report of 2 cases. *Indian J Gastroenterol* 26:293-295.

- (27) Schumann C, Faust M, Gerharz M, Ortmann M, Schubert M, Krone W 2005 Autoimmune polyglandular syndrome associated with idiopathic giant cell myocarditis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 113:302-307.
- (28) Puel A, Döffinger R, Natividad A, Chrabieh M, Barcenas-Morales G, Picard C, Cobat A, Ouachée-Chardin M, Toulon A, Bustamante J, Al-Muhsen S, Al-Owain M, Arkwright PD, Costigan C, McConnell V, Cant AJ, Abinun M, Polak M, Bougnères PF, Kumararatne D, Marodi L, Nahum A, Roifman C, Blanche S, Fischer A, Bodemer C, Abel L, Lilic D, Casanova JL 2010 Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Exp Med* 207:291-7.
- (29) Meager A, Visvalingam K, Peterson P, Möll K, Murumägi A, Krohn K, Eskelin P, Perheentupa J, Husebye E, Kadota Y, Willcox N 2006 Anti-interferon autoantibodies in autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1. *PLoS Med* 3:e289.
- (30) Silva RC, Kater CE, Dib SA, Laureti S, Forini F, Consentino A, Falorni A 2000 Autoantibodies against recombinant human steroidogenic enzymes 21-hydroxylase, side-chain cleavage and 17 α -hydroxylase in Addison's disease and autoimmune polyendocrine syndrome type III. *Eur J Endocrinol* 142:187-194.
- (31) Kamradt T, Mitchinson NA 2001 Tolerance and autoimmunity. *N Eng J Med* 344:655-664.
- (32) Tadmor B, Putterman C, Naparstek Y 1992 Embryonal germ-layer antigens: target for autoimmunity. *Lancet* 339:975-978.
- (33) Rottembourg D, Deal C, Lambert M, Mallone R, Carel JC, Lacroix A, Caillat-Zucman S, Deist F 2010 21-Hydroxylase epitopes are targeted by CD8 T cells in autoimmune Addison's disease. *J Autoimmun* 35:309-315.
- (34) Hill NJ, Hultcrantz M, Sarvetnick N, Flodstrom-Tullbreg M 2007 The target tissue in autoimmunity – an influential niche. *Eur J Immunol* 37:589-597.
- (35) Rotondi M, Falorni A, De Bellis A, Laureti S, Ferruzzi P, Romagnì P 2007 Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases. *Endocr Rev* 28:492-520.
- (36) Kanczkowski W, Zacharowski Kai, Wirth MP, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR 2009 Differential expression and action of Toll-like receptors in human adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol* 300:57-65.
- (37) Marx C, Bornstein SR, Wolkersdorfer GW 2000 Cellular immune-endocrine interaction in adrenocortical tissues. *Eur J Clin Invest* 30(Suppl. 3):1-5.
- (38) Calderon B, Suri A, Miller MJ, Unanue ER 2008 Dendritic cells in islet of Langerhans constitutively present β cell-derived peptides bound to their class II MHC molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:6121-6126.
- (39) Wong SF, Dayan CM 2008 Regulatory T cells in autoimmune endocrine diseases. *Trends Endocrinol Metab* 19:292-299.
- (40) Nikfarjam L, Kominami S, Yamazaki T, Chen S, Hewer R, Pra CD, Nakamatsu T, Betterle C, Zanchetta R, Smith BR, Furmaniak J 2005 Mechanism of inhibition of cytochrome P450 C21 enzyme activity by autoantibodies from patients with Addison's disease. *Eur J Endocrinol* 152:95-101.
- (41) Soderbergh A, Myhre AG, Ekwall O, Gebre-Medhin G, Hedstrand H, Landgren E, Miettinen A, Eskelin P, Halonen M, Tuomi T, Gustafsson J, Husebye ES, Perheentupa J, Gylling M, Manns MP, Rorsman F, Kampe O, Nilsson T 2004 Prevalence and clinical associations of 10 defined autoantibodies in autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Clin Endocrinol Metab* 89:557-562.
- (42) Nikoshkov A, Falorni A, Lajic S, Laureti S, Wedell A, Lernmark K, Luthman H 1999 A conformation-dependent epitope in Addison's disease and other endocrinological autoimmune diseases maps to a carboxyl-terminal functional domain of human steroid 21-hydroxylase. *J Immunol* 162:2422-2426.
- (43) Bratland E, Bredholt G, Mellgren G, Knappskog PM, Mozes E, Husebye ES 2009 The purification and application of biologically active recombinant steroid cytochrome P450 21-hydroxylase: The major autoantigen in autoimmune Addison's disease. *Journal of Autoimmunity* 33:58-67.
- (44) Husebye ES, Bratland E, Bredholt G, Fridkin M, Dayan M, Mozes E 2006 The substrate-binding domain of 21-hydroxylase, the main autoantigen in autoimmune Addison's disease, is an immunodominant T cell epitope. *Endocrinology* 147:2411-2416.
- (45) McLachlan SM, Rapoport B 2000 Autoimmune response to the thyroid in humans: thyroid peroxidase – the common autoantigenic denominator. *Int Rev Immunol* 19:587-618.
- (46) Hoedemaekers AC, van Breda Vriesman PJ, De Baets MH 1997 Myasthenia gravis as a prototype autoimmune receptor disease. *Immunol. Res* 16:341-354.
- (47) Volpato M, Prentice L, Chen S, Betterle C, Rees Smith B, Furmaniak J 1998 A study of the epitopes on steroid 21-hydroxylase recognized by autoantibodies in patients with or without Addison's disease. *Clin Exp Immunol* 111:422-428.
- (48) Betterle C, Volpato M, Rees-Smith B, Furmaniak J, Chen S, Greggio NA, Sanzari M, Tedesco F, Pedini B, Boscaro M, Presotto F 1997 I. Adrenal Cortex and Steroid 21-hydroxylase autoantibodies in

- adults patients with organ-specific autoimmune diseases: markers of low progression to clinical Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 82:932-938.
- (49) **Betterle C, Volpato M, Rees-Smith B, Furmaniak J, Chen S, Zanchetta R, Greggio NA, Pedini B, Boscaro M, Presotto F** 1997 II. Adrenal Cortex and Steroid 21-hydroxylase autoantibodies in children with organ-specific autoimmune diseases: markers of high progression to clinical Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 82:939-942.
- (50) **Boscaro M, Betterle C, Volpato M, Fallo F, Furmaniak J, Rees Smith B, Sonino N** 1996 Hormonal responses during various phases of autoimmune adrenal failure: no evidence for 21-hydroxylase enzyme activity in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2801-2804.
- (51) **Bratland, E, Skinningsrud B, Undlien DE, Mozes E, Husebye, ES** 2009. T cell responses to steroid cytochrome P450 21-hydroxylase in patients with autoimmune primary adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 5117-5124.
- (52) **Brozzetti A, Marzotti S, La Torre D, Bacosi ML, Morelli S, Bini V, Ambrosi B, Giordano R, Perniola R, De Bellis A, Betterle C, Falorni A; Italian Addison Network** 2010 Autoantibody responses in autoimmune ovarian insufficiency and in Addison's disease are IgG1 dominated and suggest a predominant, but no exclusive, Th1 type of response. *Eur J Endocrinol* 163:309-317.
- (53) **Betterle C, Volpato M, Pedini B, Chen S, Rees-Smith B, Furmaniak J** 1999 Adrenal- cortex autoantibodies (ACA) and steroid-producing cells autoantibodies (StCA) I patients with Addison's disease: comparison between immunofluorescence and immunoprecipitation assays. *J Clin Endocrinol Metab* 84:618-622.
- (54) **Falorni A, Laureti S, Nikoshkov A, Picchio ML, Hallengren B, Vandewalle CL, Gorus FK, Tortoioli C, Luthman H, Brunetti P, Santeusanio F** 1997 21-hydroxylase autoantibodies in adult patients with endocrine autoimmune diseases are highly specific for Addison's disease. *Clin Exp Immunol* 107:341-346.
- (55) **Laureti S, De Bellis A, Muccitelli VI, Calcinaro F, Bizzarro A, Rossi R, Bellastella A, Santeusanio F, Falorni A** 1998 Levels of adrenocortical autoantibodies correlate with the degree of adrenal dysfunction in subjects with preclinical Addison's disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83:3507-3511.
- (56) **Falorni A, Laureti S** 2000 Adrenal autoimmunity and correlation with adrenal dysfunction. *Endocrinologist* 10:145-154.
- (57) **Boe AS, Bredholt G, Knappskog PM, Hjelmervik TO, Mellgren G, Winqvist O, Kämpe O, Husebye ES** 2004 Autoantibodies against 21-hydroxylase and side-chain cleavage enzyme in autoimmune Addison's disease are mainly immunoglobulin G1. *Eur J Endocrinol* 150: 49-56.
- (58) **Betterle C, Pedini B, Presotto F** 1994 Serological markers in Addison's disease. In: Bhatt R, James VHT, Besser GM, Bottazzo GF, Keen H, eds. *Advances in Thomas Addison's diseases*, vol 2. Bristol, UK: Journal of Endocrinology Ltd. 67-84.
- (59) **Falorni A, Laureti S, Candeloro P, Perrino S, Coronella C, Bizarro A, Bellastella A, Santeusanio F, De Bellis A** 2002 Steroid-cell autoantibodies are preferentially expressed in women with premature ovarian failure who have adrenal autoimmunity. *Fertil Steril* 78:270-279.
- (60) **Bakalov VK, Anasti JN, Calis KA, Vanderhoof VH, Premkumar A, Chen S, Furmaniak J, Rees Smith B, Merino MJ, Nelson LM** 2005 Autoimmune oophoritis as a mechanism of follicular dysfunction in women with 46, XX spontaneous premature ovarian failure. *Fertil Steril* 84:958-965.
- (61) **Betterle C, Dal Pra C, Pedini B, Zanchetta R, Albergoni MP, Chen S, Furmaniak J, Rees Smith B** 2004 Assessment of adrenocortical function and autoantibodies in a baby born to a mother with autoimmune polyglandular syndrome type 2. *J Endocrinological Invest* 27:618-621.
- (62) **Freeman M, Weetman AP** 1992 T and B cell reactivity to adrenal antigens in autoimmune Addison's disease. *Clin. Exp. Immunol.* 88:275-279.
- (63) **Vendrame F, Segni M, Grasseti D, Tellone V, Augello G, Trischitta V, Torlontano M, Dotta F** 2006 Impaired caspase-3 expression by peripheral T cells in chronic autoimmune thyroiditis and in autoimmune polyendocrine syndrome-2. *J Clin Endocrinol Metab* 91:5064e8.
- (64) **Kriegel MA, Lohmann T, Gabler C, Blank N, Kalden JR, Lorenz HM** 2004 Defective suppressor function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 199:1285-1291.
- (65) **Bellastella G, Rotondi M, Pane E, Costantini S, Colella C, Calemma R, Capone F, Falorni A, Castello G, Sinisi AA, Bizzarro A, Chiovato L, Bellastella A, De Bellis A** 2011 Simultaneous evaluation of the circulating levels of both Th1 and Th2 chemokines in patients with autoimmune Addison's disease. *J Endocrinol Invest* 34: 831-834.
- (66) **Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK** 2007 T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 8:345-350.
- (67) **Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK** 2008 Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453: 1051-1057.

- (68) Skinningsrud B, Lie BA, Lavant E, Carlson JA, Erlich H, Akselsen HE, Gervin K, Wolff AB, Erichsen MM, Løvås K, Husebye ES, Undlien DE 2011 Multiple loci in the HLA complex are associated with Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 96: E1703-E1708.
- (69) Baker PR, Baschal EE, Fain PR, Nanduri P, Triolo TM, Siebert JC, Armstrong TK, Babu SR, Rewers MJ, Gottlieb PA, Barker JM, Eisenbarth GS 2011 Dominant Suppression of Addison's Disease Associated with HLA-B15. *J Clin Endocrinol Metab* 96:2154-2162.
- (70) Baker PR, Baschal EE, Fain PR, Triolo TM, Nanduri P, Siebert JC, Armstrong TK, Babu SR, Rewers MJ, Gottlieb PA, Barker JM, Eisenbarth GS. Haplotype analysis discriminates genetic risk for DR3-associated endocrine autoimmunity and helps define extreme risk for Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2010 95:E263-E270.
- (71) Yu L, Brewer KW, Gates S, Wu A, Wang T, Babu SR, Gottlieb PA, Freed BM, Noble J, Erlich HA, Rewers MJ, Eisenbarth GS 1999 DRB1*04 and DQ alleles: expression of 21-hydroxylase autoantibodies and risk of progression to Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 84:328-335.
- (72) Gambelunghe G, Kockum I, Bini V, De Giorgi G, Celi F, Betterle C, Giordano R, Libè R, Falorni A 2005 Retrovirus-like long-terminal repeat DQ-LTR13 and genetic susceptibility to type 1 diabetes and autoimmune Addison's disease. *Diabetes* 54:900-905.
- (73) Gambelunghe G, Falorni A, Ghaderi M, Laureti S, Tortoioli C, Santeusano F, Brunetti P, Sanjeevi CB 1999 Microsatellite polymorphism of the MHC class I chain-related (MIC-A and MIC-B) genes marks the risk for autoimmune Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3701-3707.
- (74) Gombos Z, Hermann R, Kiviniemi M, Nejntsev S, Reimand K, Fadeyev V, Peterson P, Uibo R, Ilonen J 2007 Analysis of extended human leukocyte antigen haplotype association with Addison's disease in three populations. *Eur J Endocrinol* 157:757-761.
- (75) Park YS, Sanjeevi CB, Robles D, Yu L, Rewers M, Gottlieb PA, Fain P, Eisenbarth GS 2002 Additional association of intra-MHC genes, MICA and D6S273, with Addison's disease. *Tissue Antigens* 60:155-163.
- (76) Pani MA, Seissler J, Usadel KH, Badenhop K 2002 Vitamin D receptor genotype is associated with Addison's disease. *Eur J Endocrinol* 147:635-640.
- (77) Jennings CE, Owen CJ, Wilson V, Pearce SH 2005 A haplotype of the CYP27B1 promoter is associated with autoimmune Addison's disease but not with Graves' disease in a UK population. *J Mol Endocrinol* 34:859-863.
- (78) Vaidya B, Pearce S 2004 The emerging role of the CTLA-4 gene in autoimmune endocrinopathies. *Eur J Endocrinol* 150:619-626.
- (79) Blomhoff A, Lie BA, Myhre AG, Kemp EH, Weetman AP, Akselsen HE, Husebye ES, Undlien DE 2004 Polymorphisms in the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene region confer susceptibility to Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3474-3476.
- (80) Brozzetti A, Marzotti S, Tortoioli C, Bini V, Giordano R, Dotta F, Betterle C, De Bellis A, Arnaldi G, Toscano V, Arvat E, Bellastella A, Mantero F, Falorni A; Italian Addison Network 2010 Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 Ala17 polymorphism is a genetic marker of autoimmune adrenal insufficiency: Italian association study and meta-analysis of European studies. *Eur J Endocrinol* 162:361-369.
- (81) Donner H, Braun J, Seidl C, Rau H, Finke R, Ventz M, Walfish PG, Usadel KH, Badenhop K 1997 Codon 17 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene in Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 4130-4132.
- (82) Ghaderi M, Gambelunghe G, Tortoioli C, Brozzetti A, Jatta K, Gharizadeh B, De Bellis A, Pecori Giraldo F, Terzolo M, Betterle C, Falorni A 2006 MHC2TA single nucleotide polymorphism and genetic risk for autoimmune adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4107-4111.
- (83) Skinningsrud B, Husebye ES, Pearce SH, McDonald DO, Brandal K, Wolff AB, Løvås K, Egeland T, Undlien DE 2008 Polymorphisms in CLEC16A and CIITA at 16p13 are associated with primary adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 93:3310-3317.
- (84) Roycroft M, Fichna M, McDonald D, Owen K, Zurawek M, Gryczyńska M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Fichna P, Cordell H, Donaldson P, Nowak J, Pearce S 2009 The tryptophan 620 allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22) gene predisposes to autoimmune Addison's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 70:358-362.
- (85) Skinningsrud B, Husebye ES, Gervin K, Løvås K, Blomhoff A, Wolff AB, Kemp EH, Egeland T, Undlien DE 2008 Mutation screening of PTPN22: association of the 1858T-allele with Addison's disease. *Eur J Hum Genet* 16:977-982.
- (86) Vang T, Miletic AV, Bottini N, Mustelin T 2007 Protein tyrosine phosphatase PTPN22 in human autoimmunity. *Autoimmunity* 40:453-461.
- (87) Mitchell AL, Cordell HJ, Soemedi R, Owen K, Skinningsrud B, Wolff AB, Ericksen M, Undlien D, Husebye E, Pearce SH 2009 Programmed death ligand 1 (PD-L1) gene variants contribute to autoimmune Addison's disease and Graves' disease susceptibility. *J Clin Endocrinol Metab* 94:5139-5145.

- (88) **Magitta NF, Bøe Wolff AS, Johansson S, Skinningsrud B, Lie BA, Myhr KM, Undlien DE, Joner G, Njølstad PR, Kvien TK, Førre Ø, Knappskog PM, Husebye ES** 2009 A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. *Genes Immun* 10:120-124.
- (89) **Zurawek M, Fichna M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Gryczyn M, Fichna P, Nowak J** 2010 A coding variant in NLRP1 is associated with autoimmune Addison's disease. *Hum Immunol* 71:530-534.
- (90) **Brønstad I, Wolff AS, Løvås K, Knappskog PM, Husebye ES** 2011 Genome-wide copy number variation (CNV) in patients with autoimmune Addison's disease. *BMC Med Genet* 12:111.
- (91) **Gan EH, Mitchell AL, Macarthur K, Pearce SH** 2011 The role of a nonsynonymous CD226 (DNAX-accessory molecule-1) variant (Gly 307Ser) in isolated Addison's disease and autoimmune polyendocrinopathy type 2 pathogenesis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 75:165-168.
- (92) **Hafler JP, Maier LM, Cooper JD, Plagnol V, Hinks A, Simmonds MJ, Stevens HE, Walker NM, Healy B, Howson JM, Maisuria M, Duley S, Coleman G, Gough SC; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Worthington J, Kuchroo VK, Wicker LS, Todd JA** 2009 CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases. *Genes Immun* 10:5-10.