

RESUMO

A hiperplasia congênita da adrenal devido à deficiência da enzima 11 \Rightarrow hidroxilase é resultado de uma falha na conversão do 11-desoxicortisol em cortisol na última etapa da via sintética dos glicocorticóides. Em geral, esta forma da doença é responsável por cerca de 5% dos casos. A manifestação clínica do excesso de andrógenos em pacientes do sexo feminino inclui graus de ambigüidade genital que podem variar entre uma clitoromegalia até a virilização completa da genitália. Devido ao acúmulo de mineralocorticóides, aproximadamente 50% dos pacientes desenvolvem hipertensão arterial. Mutações no gene *CYP11B1*, que codifica a enzima 11 \Rightarrow hidroxilase, são responsáveis pela doença. As características bioquímicas e moleculares da enzima e suas implicações na apresentação clínica da deficiência da 11 \Rightarrow hidroxilase são abordadas no presente trabalho de revisão. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/5:713-723**)

Descritores: Deficiência da 11 \Rightarrow hidroxilase; Gene *CYP11B1*; Hiperplasia congênita da adrenal

ABSTRACT

11 \Rightarrow Hydroxylase Deficiency.

Congenital adrenal hyperplasia due to 11 \Rightarrow hydroxylase enzyme deficiency is a result of the impairment of 11-deoxycortisol to cortisol conversion. In general, it is responsible for less than 5% of the congenital adrenal hyperplasia cases. The clinical expression of androgen excess in females includes several degrees of genital ambiguity, varying from clitoromegaly to complete virilization. Due to the accumulation of mineralocorticoids, approximately 50% of the patients develop blood hypertension. Mutations in the *CYP11B1* gene are responsible for the disease. Biochemical and molecular characteristics of the enzyme and their implications in the clinical presentation of 11 \Rightarrow hydroxylase deficiency are reviewed here. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/5:713-723**)

Keywords: 11 \Rightarrow Hydroxylase deficiency; *CYP11B1* Gene; Congenital adrenal hyperplasia

*Maricilda Palandi Mello
Junia Yara Penachioni
Fernando C. do Amaral
Margaret de Castro*

*Centro de Biologia Molecular e
Engenharia Genética (CBMEG –
MPM, JYP), Universidade
Estadual de Campinas
(UNICAMP), Campinas; e
Departamento de Endocrinologia
(FCA, MC), Faculdade de
Medicina-Ribeirão Preto –
Universidade de São Paulo
(FMRPUSP), Ribeirão Preto, SP.*

*Recebido em 08/08/04
Aceito em 13/08/04*

AS TRÊS CAMADAS DAS ADRENAIS, glomerulosa, fasciculada e reticular, possuem papéis funcionais distintos na produção os hormônios esteróides. Na camada fasciculada, ocorre a biossíntese do cortisol, o principal glicocorticóide humano e, na camada glomerulosa, é produzida a aldosterona, que é o mineralocorticóide humano mais potente. Existem algumas questões ainda em aberto a respeito da zonação adrenal, porém fica clara a necessidade de divisão funcional quando se considera que a quantidade de aldosterona necessária para o controle do balanço salino é cerca de 100 a 1000 vezes menor que a quantidade de cortisol necessário para o con-

trole do metabolismo do carboidrato. Assim, sem a divisão funcional haveria um excesso de mineralocorticóide caso os precursores progesterona e 11-desoxicorticosterona, que são também sintetizados na camada fasciculada em quantidades elevadas, fossem convertidos a aldosterona. Portanto, a função principal da divisão em zonas do córtex adrenal é sem dúvida o controle da produção relativa de mineralocorticóides e glicocorticóides (1).

A biossíntese do cortisol na zona fasciculada, que é regulada principalmente pelo ACTH (2), requer a ação de cinco enzimas, das quais a colesterol desmolase, a 3 \Rightarrow hidroxiesteróide desidrogenase e a 21-hidroxilase são também necessárias à síntese de aldosterona na zona glomerulosa, que, por sua vez, é regulada principalmente pelas concentrações de angiotensina II e potássio (3). Para as biossíntese tanto do cortisol como da aldosterona é necessária a hidroxilação na posição 11 \Rightarrow da 11-desoxicorticosterona e do 11-desoxicortisol, respectivamente. No entanto, estes passos são catalisados por enzimas diferentes. Assim, a propriedade do córtex adrenal de produzir de forma diferenciada a aldosterona e o cortisol se deve em grande parte à expressão das enzimas aldosterona sintase (CYP11B2) e 11 \Rightarrow hidroxilase (CYP 11B1). A enzima CYP11B2, que se expressa em pequena quantidade somente na camada glomerulosa do córtex adrenal (4-6), apresenta atividades de 11 \Rightarrow hidroxilase (11 \Rightarrow OH), de 18-hidroxilase e de metil oxidase catalisando, assim, os passos finais da biossíntese de aldosterona (7-10). Por outro lado, a CYP11B1, que apresenta principalmente a atividade de 11 \Rightarrow OH, se expressa em grande quantidade nas camadas fasciculada e reticular, transformando o 11-desoxicortisol em cortisol (11). Recentemente, foi constatada uma concentração de CYP11B1 mais elevada na camada fasciculada em relação à da camada reticular em células da adrenal humana (12), indicando sua maior ação nesta camada da adrenal. As diferenças na produção de cortisol e aldosterona não se restringem apenas ao local onde ocorrem as respectivas biossínteses, o que diz respeito à regulação transcricional das enzimas, mas também se estendem às atividades catalíticas específicas das vias dos glicocorticóides e dos mineralocorticóides, consequentemente estas diferenças se manifestam nas diversas anomalias com características próprias. Mutações no gene que codifica a enzima CYP11B1 causam hiperplasia congênita da adrenal (HCA), ao passo que as mutações no gene que codifica a enzima CYP11B2 são as causas da deficiência de corti-

costerona metil oxidase ou deficiência da aldosterona sintase.

As Isoenzimas 11 \Rightarrow Hidroxilase e Seus Mecanismos Catalíticos

As isoenzimas 11 \Rightarrow OH são da família do citocromo P-450 mitocondriais chamadas CYP11. Cada uma é sintetizada com 503 resíduos de aminoácidos (13,14), porém o peptídeo de sinal de 24 aminoácidos é eliminado na mitocôndria para produzir as proteínas maduras com 479 aminoácidos. As enzimas maduras apresentam identidade de cerca de 93%, sendo ao todo 29 resíduos diferentes localizados fora dos sítios de reconhecimento dos substratos (15).

Da mesma forma que outras enzimas P450, as CYP11B1 e CYP11B2 usam o oxigênio molecular e agentes redutores mediados pelo NADPH para catalisar reações de hidroxilação específicas (16). Neste caso, os elétrons, agentes redutores, não são recebidos diretamente do NADPH. Duas proteínas acessórias são usadas, em seqüência, como transportadoras de elétrons. Assim, a adrenodoxina redutase recebe os elétrons da NADPH e os doa à adrenodoxina, também chamada de ferredoxina, que por sua vez os transfere ao citocromo P450 (17). Estas proteínas intermediárias são necessárias porque o NADPH doa elétrons em pares enquanto que os citocromos P450 recebem um único elétron por vez (18).

A interação entre o citocromo P450 e a adrenodoxina se dá entre resíduos de aminoácidos básicos no P450 (19-21) e resíduos ácidos e, também, hidrofóbicos na adrenodoxina (22). Informações baseadas na estrutura protéica são difíceis de se obter pelos estudos de difração de raios-X ou por ressonância magnética nuclear para as CYP11B humanas pelo fato de serem proteínas associadas à membrana. Assim, estudos comparativos com proteínas homólogas (19,23-26) e estudos de cristalografia das enzimas P450 bacterianas (27,28), indicam que as posições aminoacídicas R366 e K370 nas isoenzimas de CYP11B são provavelmente muito importantes para que esta interação ocorra corretamente (29). Vários aminoácidos são conservados na estrutura polipeptídica das isoenzimas e são importantes para que suas funções sejam exercidas corretamente. Nas CYP11B, um resíduo de cisteína, na posição nucleotídica 450 faz a interação com o centro do sítio catalítico que é ocupado por um grupo heme (30).

De acordo com um dos diversos modelos propostos de catálise, o primeiro passo da reação é a ligação do substrato à enzima oxidada. Um elétron é doado pela adrenodoxina à enzima de modo que o

ferro se torne reduzido. Este complexo liga o oxigênio molecular e aceita, então, um segundo elétron de uma outra molécula reduzida da adrenodoxina, deixando a molécula de oxigênio com uma carga negativa. O átomo de oxigênio aceita dois prótons de um resíduo conservado de treonina (T318 nas isoenzimas de CYP11B) (28). O átomo de oxigênio é então liberado, deixando o ferro no estado oxidado. O átomo de oxigênio restante é altamente reativo e ataca o substrato, tendo por resultado uma hidroxilação.

Embora as CYP11B1 e CYP11B2 separadamente apresentem atividades *in vitro* frente aos precursores de cortisol e aldosterona, a atividade e especificidade de expressão de cada uma *in vivo* são diferenciadas. A reconstituição *in vitro* da cadeia de transferência de elétrons da CYP11B1 mostrou: a) uma 11 \Rightarrow hidroxilação eficiente de 11-desoxicorticosterona e de 11-desoxicortisol; b) uma baixa atividade de 18-hidroxilase; c) uma atividade nula de 18-oxidase (14,31). Já a CYP11B2 humana apresenta fraca atividade de 11 \Rightarrow hidroxilase frente ao 11-desoxicortisol, mas é capaz de hidroxilar com eficiência a 11-desoxicorticosterona a corticosterona, além disso, hidroxila e oxida com eficiência a posição 18 para a produção de 18-hidroxycorticosterona e aldosterona, respectivamente (31). O que diferencia o processo *in vivo* é que ao final da reação de 11-hidroxilação, no caso da CYP11B1, o esteróide hidroxilado (corticosterona ou cortisol) é liberado; já para a CYP11B2 o processo é mais complexo porque esta enzima executa três conversões oxidativas sucessivas. Há várias evidências de que o esteróide não é liberado após a hidroxilação 11 \Rightarrow e permanece ligado durante as duas conversões seguintes. White e cols. (30) descreveram que apenas a 11-desoxicorticosterona é um bom substrato para o CYP11B2 humano para formar aldosterona eficientemente. Quando testaram a síntese de aldosterona a partir da corticosterona e da 18-hidroxycorticosterona isoladamente sob ação da CYP11B2, a reação apresentou baixa eficiência. Posteriormente, por estudos de cinética, ficou demonstrado que a aldosterona é formada por reações sucessivas via corticosterona sem liberação dos produtos intermediários (32,33).

A especificidade funcional das CYP11B2 e CYP11B1 se deve a diferenças de alguns aminoácidos em posições importantes para a atividade enzimática. Por exemplo, as trocas de aminoácidos S288G e V320A na enzima produtora de cortisol, CYP11B1, é suficiente para transformá-la em uma enzima produtora de aldosterona, CYP11B2 (34). Os resultados de experimentos com substituições recíprocas demonstram que os aminoácidos específicos em cada isoenzi-

ma presentes na região que compreende as posições 289 a 340 são importantes na CYP11B2 para a atividade 18-hidroxilase e 18-oxidase e, na CYP11B1, para a atividade de 11 \Rightarrow OH (35). Além disso, a interconversão entre as isoenzimas sugerem que o resíduo 147 tenha um papel importante na atribuição da especificidade de 11 \Rightarrow hidroxilação frente aos substratos 11-desoxicorticosterona e 11-desoxicortisol (36,37).

Genética das Isoenzimas 11 \Rightarrow Hidroxilase

As isoenzimas CYP11B1 e CYP11B2 são codificadas em humanos por dois genes distintos que se localizam no cromossomo 8 (13,14,38), mais precisamente o gene *CYP11B2* foi mapeado na banda citogenética 8q24.3 (39).

À semelhança dos genes da 21-hidroxilase (*CYP21P* e *CYP21*), a presença de dois genes para 11 \Rightarrow hidroxilase parece ser o resultado da duplicação do gene original (40). No caso de *CYP21P* e *CYP21*, onde *CYP21P* é um pseudogene (41), a duplicação aparentemente foi seguida de um "silenciamento" de uma das cópias, através do acúmulo de mutações. Por outro lado, os dois genes *CYP11B* são ativos (42), indicando que, neste caso, a duplicação pode ter iniciado um processo de especialização das funções metabólicas das enzimas que culminou na separação espacial de sua expressão na glândula (30).

Os genes *CYP11B1* e *CYP11B2* apresentam 9 éxons e 8 íntrons, dispostos em 7kb de extensão e guardam uma distância entre si de cerca de 40kb (13,43). São 95% homólogos na seqüência nucleotídica dos éxons, 90% nos íntrons. As seqüências de menor similaridade concentram-se nas regiões terminais 5' (*upstream* ao códon de iniciação de tradução ATG) (44-46).

Como ambos genes são ativos e expressam RNAs diferentes, a probabilidade de perpetuação de mutações deletérias previamente armazenadas em regiões de baixa pressão seletiva (como em *CYP21P*), graças à recombinação em emparelhamento desigual com o gene homólogo, é pouco significativa (47). Assim, cruzamentos desiguais e eventos de conversão podem existir (48), mas não são importantes geradores de alelos deletérios e, quando acontecem (figura 1), induzem patologias diferenciadas (30,47, 49,50). Genes híbridos *CYP11B1/2* resultantes de processos de duplicações por recombinação intergênica, justapondo-se o promotor do *CYP11B1* com seqüências codificadoras do *CYP11B2*, acontecem e estão associados aos casos de hiperaldosteronismo controlável por glicocorticóides (51-54). Neste processo, o gameta resultante apresenta o gene híbrido intercalado aos genes *CYP11B2* e *CYP11B1*. O

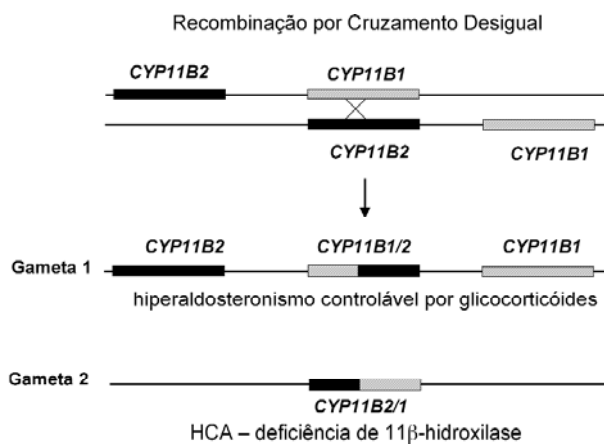


Figura 1. Crossing over desigual entre *CYP11B1* e *CYP11B2*. *CYP11B2* está à esquerda e é 95% similar ao *CYP11B1*. A direção de transcrição ocorre da esquerda para a direita. Um emparelhamento desigual entre estes genes durante uma meiose resulta em um gameta com material genético duplicado, contendo um gene híbrido com seqüências 5' de *CYP11B1* e seqüências 3' de *CYP11B2*. Este alelo está normalmente presente em pacientes com hiperaldosteronismo controlável por glicocorticóides. O segundo gameta é deficiente, contendo somente o gene híbrido complementar e é relacionado à hiperplasia congênita da adrenal por deficiência de 11 \Rightarrow hidroxilase.

gene quimérico recíproco (*CYP11B2/1*) resultante de um evento de deleção está associado à deficiência de 11 \Rightarrow OH (55,56).

Mutações deletérias no gene *CYP11B1*, que codifica a enzima 11 \Rightarrow OH, são encontradas em pacientes com deficiência de 11 \Rightarrow OH e são correlacionadas com alterações em resíduos importantes para a atividade enzimática ou com interrupções da transcrição normal do gene, gerando mRNA alterados e, conseqüentemente, proteínas truncadas (47,57-63).

A hiperplasia congênita da adrenal (HCA) por deficiência da 11 \Rightarrow OH corresponde a, no máximo, 5% dos casos de HCA, com freqüência estimada de 1:100.000 nascimentos (64). No entanto, em populações com alto grau de endogamia, uma freqüência maior é registrada: 1:30-40.000 em Israel, 1:5-7.000 em judeus provenientes do Marrocos (65) e pode chegar a mais de 25% dos casos de HCA na Arábia Saudita (66). Algumas mutações são recorrentes, principalmente, em certos grupos étnicos com alto grau de endogamia (judeus iranianos e marroquinos), o que sugere um efeito fundador na origem e irradiação dos alelos mutantes (67). Além das mutações R448H e R448C características destes grupos (60,65), a mutação Q356X foi descrita em pacientes americanos de origem africana (47,68). No Brasil, a mutação Q356X foi a primeira a ser descrita em uma paciente da raça negra (69). Posteriormente, a mesma mutação foi encontrada

em outros cinco pacientes brasileiros negros não relacionados, indicando um possível efeito fundador nesse grupo étnico na população brasileira (70).

O quadro geral atualizado de mutações no gene *CYP11B1* (figura 2) mostra, ao todo, 39 mutações divididas em 7 que geram códon de terminação de síntese protéica, 20 são trocas de aminoácidos, 7 alteram o quadro de leitura por inserção ou deleção de nucleotídeos e 5 alteram ou geram sítios de *splicing* alternativos. Curiosamente, 19/39 das mutações deletérias (figura 2) para a hidroxilação em c11 de 11 \Rightarrow OH estão situadas entre os éxons 6-8 (47), formando um *cluster* de mutações na proteína *CYP11B1*. Duas hipóteses têm sido levantadas para explicar essa concentração: mutações nessas regiões aconteceriam com a mesma freqüência que no resto dos éxons, porém teriam maior probabilidade de serem deletérias na atividade enzimática ou a região do *cluster* representaria uma área *hot-spot* no gene *CYP11B1*, estando por alguma razão mais suscetível à mutações. Na verdade, cinco das oito mutações pontuais mais freqüentes (T318M, R374Q, R384Q, R448H e R448C) são transições CpG>TpG, sendo este o grupo de transições mais comuns nos eventos de mutações pontuais do genoma humano (71). Coincidência ou não, 49% dos dinucleotídeos CpG da região codificadora de *CYP11B1* estão dentro da região que engloba os éxons 6 ao 8. Se comparado ao genoma codificador em geral, que apresenta 1,5% de CpG (71), a região do *cluster* de mutações de *CYP11B1* apresenta uma porcentagem duas vezes maior (~3%) dessa composição nucleotídica, sugerindo que a taxa mutacional aumentada, encontrada nessa região, possa ser realmente devido ao fato de se tratar de uma área *hot-spot*, como propõe Curnow e cols. (47). Uma nova mutação no éxon 8 foi encontrada em uma paciente de origem árabe no Brasil. Trata-se da inserção de uma citosina; isto faz com que o quadro de leitura para a síntese protéica sofra um deslocamento, a arginina do códon 404 é substituída por uma prolina e, na posição 421, forma-se um códon de terminação (72). Considera-se que a atividade enzimática da proteína produzida a partir do gene mutado seja nula pelo fato de não possuir os aminoácidos essenciais (em especial o resíduo C450) para a ligação com o grupamento heme compreendidos entre os resíduos 443-463 (30).

É interessante ressaltar que, nesse quadro de mutações, alguns códons são alterados com mutações diferentes, como é o caso do códon 318, cujo aminoácido treonina está envolvido na transferência de carga durante o processo de oxidação (28). Neste códon, foram registradas as trocas de aminoácidos T318R e

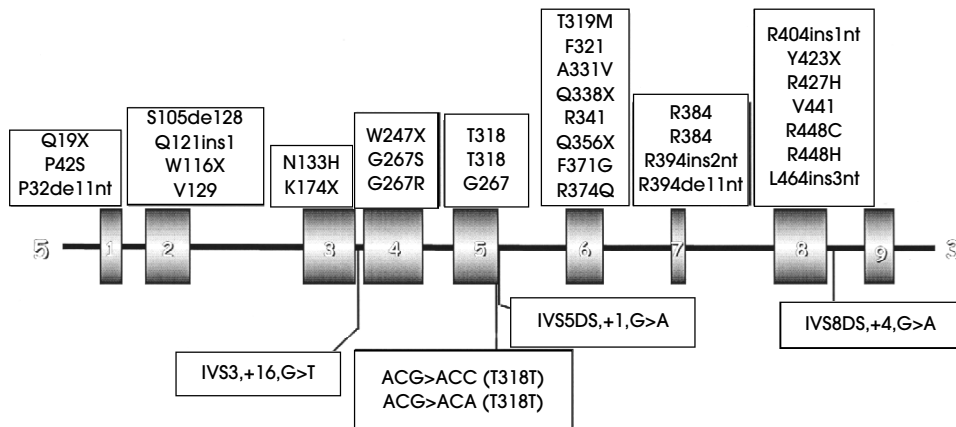


Figura 2. Organização dos 9 éxons e 8 íntrons do gene *CY11B1*. São mostradas as mutações encontradas em pacientes com hiperplasia congênita da adrenal por deficiência de 11 \Rightarrow hidroxilase (*Human Gene Mutation Database* - <http://uwcmml1s.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/120603.html>).

T318M (47,68). O mesmo pode ser observado para os códons 384 e 448, onde as trocas de aminoácidos R384Q/R384G e R448H/R448C, respectivamente, foram detectadas em pacientes com deficiência de 11 \Rightarrow OH. O curioso é que, no códon 318, além das mutações já citadas, podem ocorrer as trocas nucleotídicas conservativas ACG>ACC e ACG>ACA (T318T), mas como o terceiro nucleotídeo do códon é também o último do éxon 5, estas substituições, embora não alterem a seqüência protéica, têm um significado biológico alterando o processo de *splicing*, pois a posição onde ocorrem faz parte do sítio doador de *splicing* (73,74). Outras três variações intrônicas produzem mRNAs diferentes por modificarem o processo de *splicing* (55,68,74). Da mesma forma, as mutações no códon 267 (G267R/G267D) podem induzir um processo de *splicing* alterado, visto que se situam dentro da seqüência consenso do *splicing* do íntron 4, isto é, o códon é formado pelo último nucleotídeo do éxon 4 e pelos dois primeiros nucleotídeos do éxon 5. No estudo realizado pelo nosso grupo, foi identificada uma terceira mutação no códon 267, que troca uma glicina por serina (75). É importante, também, salientar que o gene *CYP11B1* pode apresentar vários polimorfismos que podem ser de nucleotídeos geralmente provenientes do *CYP11B2* ou trocas nucleotídicas representando mutações silenciosas ou mesmo variações intrônicas (69).

Apresentação Clínica da 11 \Rightarrow Hidroxilase

A deficiência da 11 \Rightarrow OH foi primeiramente relatada por Eberlein e Bongiovani em 1955. Na HCA devido à deficiência da 11 \Rightarrow OH, ocorre diminuição da produção

de cortisol com superprodução de andrógenos e mineralocorticóides. A secreção intra-útero excessiva dos andrógenos adrenais produz virilização do feto feminino (47,57-59,61,62,76-78). O desenvolvimento da genitália em feminina ou masculina começa em torno da sexta semana de gestação. Em meninas afetadas, a secreção excessiva de andrógenos adrenais começa aproximadamente nesse mesmo tempo e produz efeitos nas estruturas genitais externas similares àquelas que ocorrem em fetos masculinos normais, como o alargamento do tubérculo genital, levando a vários graus de clitoromegalia e fusão das pregas lábio escrotais. Dependendo da severidade da virilização, o seio urogenital pode se abrir no períneo, na base do falo ou até mesmo na glande. Se a fusão for completa, a estrutura resultante é indistinguível da bolsa escrotal masculina, embora os testículos não estejam presentes. Em alguns casos, por ser difícil a identificação da genitália externa, podendo ser confundida com uma genitália masculina criptorquídica, meninas podem ser freqüentemente criadas, até a idade adulta, como meninos (30).

Em contraste com a genitália externa, as gônadas e as estruturas genitais internas (tubos de Falópio, útero e cérvix) provenientes dos ductos Müllarianos se desenvolvem normalmente em crianças do sexo feminino afetadas, pois o fator de inibição dos ductos Müllarianos, que causa a involução destas estruturas no sexo masculino, não é produzido pelo ovário fetal. Assim, meninas afetadas têm potencial reprodutivo intacto se suas anormalidades genitais externas forem corrigidas cirurgicamente e a secreção excessiva de andrógenos adrenais for controlada com glicocorticóides. Por esta razão, é importante que

meninas afetadas sejam criadas desde a infância como meninas, mesmo que o grau de virilização da genitália externa seja grave (30).

Outros sinais de excesso de andrógenos ocorrem no período pós-natal e incluem crescimento somático e maturação esquelética acelerados em crianças, levando ao fechamento prematuro das epífises e baixa estatura adulta. Adicionalmente, os pacientes podem ter desenvolvimento sexual e adrenarca prematuros e presença de acne. Andrógenos podem afetar o eixo hipotalâmico-pituitária-gonadal levando à amenorréia ou oligomenorréia em meninas e puberdade precoce e, inversamente, baixa espermatogênese no sexo masculino.

A hipertensão arterial com alcalose hipercalemica devido ao excesso de produção de DOC é uma das características que distingue a deficiência de 11 \Rightarrow OH da deficiência da 21-OH. Entretanto, a hipertensão arterial pode ou não estar presente (79-81) e é observada em 30-60% dos casos (64,65,82). A hipertensão, muitas vezes, só se manifesta nas fases mais tardias da infância ou adolescência (83) e é atribuída ao excesso de DOC. Embora a hipertensão seja a principal característica da deficiência da 11 \Rightarrow OH, ocasionalmente alguns pacientes, durante a infância, desenvolvem sinais de deficiência de mineralocorticóides, incluindo hipercalemia, hiponatremia e hipovolemia. Em alguns casos, isso pode ocorrer pela terapia com glicocorticóides, pois a função da zona glomerulosa pode estar cronicamente suprimida pela hipersecreção de desoxicorticosterona antes do tratamento, e um rápido decréscimo nos níveis de desoxicorticosterona pode não ser imediatamente compensado pelo aumento adequado na secreção de aldosterona (30). Entretanto, em alguns casos, a deficiência de mineralocorticóides tem se apresentado antes do tratamento. O mecanismo pelo qual isto ocorre não está bem entendido, dado que a aldosterona é sintetizada pela enzima CYP11B2, que não está afetada na deficiência da 11 \Rightarrow OH (30).

Em alguns casos, ocorre a deficiência da 11 \Rightarrow OH denominada não-clássica ou parcial. Esta é uma etiologia relativamente incomum. Entretanto, a sutileza com que esta variante se manifesta e as dificuldades associadas com o seu diagnóstico podem retardar sua identificação e resultar em uma redução significativa na estatura adulta se não tratada precocemente com reposição hormonal (84). As principais diferenças entre a deficiência da 11 \Rightarrow OH parcial e a forma clássica indicam que a incidência da deficiência da 11 \Rightarrow OH parcial é mais baixa; no sexo feminino, a virilização pré-natal ocorre em alguns casos de deficiência da 11 \Rightarrow OH parcial, já na forma clássica está quase sempre

presente; hipertensão aparece em alguns casos de deficiência da 11 \Rightarrow OH parcial e está quase sempre presente na forma clássica. Pacientes com a forma não-clássica de deficiência de 11 \Rightarrow OH nascem com a genitália normal (algumas meninas afetadas apresentam clitoromegalia leve) e apresentam sinais e sintomas de excesso de andrógenos quando crianças. Mulheres adultas podem apresentar hirsutismo e oligomenorréia. Entretanto, a deficiência da 11 \Rightarrow OH é provavelmente responsável por menos de 1% dos casos de hirsutismo não selecionado e/ou oligomenorréia hiperandrogênica, usando como critério diagnóstico os elevados níveis séricos de 11-desoxicortisol depois de estimulação com ACTH. A frequência da deficiência da 11 \Rightarrow OH não-clássica na população geral não é conhecida (30). Embora frequentemente citada, a forma não-clássica de deficiência de 11 \Rightarrow OH não parece frequente e, ainda, se discute parâmetros para definição do seu diagnóstico (85).

A tabela 1 apresenta as principais características clínicas observadas em pacientes brasileiros portadores da forma clássica de deficiência da 11 \Rightarrow OH, cuja genética molecular foi avaliada. Esses indivíduos foram trazidos para a primeira consulta com idades que variaram desde dias ou meses ou anos, sendo que em um dos indivíduos o diagnóstico foi realizado somente na idade adulta. A maioria dos pacientes apresentava a relação peso/altura acima da média para a idade devido ao excesso de andrógenos. No entanto, um dos pacientes com a idade de 5 anos e 11 meses apresentava relação peso/altura igual a um outro paciente com 12 anos e 4 meses, isto se deve ao fato do primeiro apresentar anemia falciforme, uma doença crônica grave que com certeza interferiu no seu desenvolvimento. O diagnóstico da deficiência de 11 \Rightarrow OH nem sempre foi imediato e, em alguns casos, os pacientes foram inicialmente tratados como deficiência de 21-hidroxilase. O estágio puberal na época do diagnóstico nem sempre coincidiu com o da primeira consulta. Assim, ao diagnóstico, as crianças impúberes e pré-púberes apresentavam pelos pubianos que variaram de Tanner PII-PV; já os pacientes em fase puberal ou adulta, pacientes apresentavam pilificação compatíveis com a faixa etária (Tanner PIII-PV). Os indivíduos com sexo genético 46,XX apresentaram genitália ambígua desde o nascimento, em graus que variaram desde clitoromegalia com fusão de rafe a micropênis com criptorquidia bilateral, enquanto os indivíduos 46,XY desenvolveram sinais de hiperandrogenismo após o nascimento. O dado fundamental para o diagnóstico clínico da deficiên-

Tabela 1. Principais características clínicas e mutações no gene CYP11B1 observadas em pacientes brasileiros portadores da deficiência da 11 \Rightarrow hidroxilase forma clássica que tiveram avaliação molecular.

Paciente	Idade na 1ª consulta	Peso (kg)	Altura (cm)	Idade do diagnóstico	Genitália	Pilificação	Pressão Arterial (mmHg)	Cariótipo	Mutação
1	3m16d	4,6	57	2a8m	clitoromegalia (2,5 x 1,0cm)	Tanner PII	140/90	46,XX	Q356X
2	20ª	51,5	160	20a	clitóris sepultado, orifício perineal único	Tanner PV	160/110	46,XX	Q356X
3	5a6m	19,0	110	5a6m	Micropênis Criptoquirdia bilateral	Tanner PIII	100/60	46,XX	G267S
4	3d	3,9	53	11a3m	clitoromegalia		140/110	46,XX	3275-3276insC
5	2m	4,8	58	7a 11m	hiperandrogenismo	Tanner PIV	130/80	46,XY	Q356X
6	12a4m	36,7	145,0	21a4m	Ambígua com clitoromegalia	Tanner PII Tanner PIII	90/65	46,XX	Q356X
7	5a11m	37,9	145,5	5a11m	hiperandrogenismo		140/90	46,XY	Q356X
8	1m11d	5,1	53,5	4m	Clitoromegalia, fusão de rafe	Tanner PIV Tanner PIII	100/70	46,XX	Q356X

cia de 11 \Rightarrow OH foi a verificação da pressão arterial elevada em todos os casos, com exceção de apenas um paciente.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Na deficiência de 11 \Rightarrow OH, 11-desoxicortisol e desoxicorticosterona (DOC) não são convertidos eficientemente a cortisol e corticosterona, respectivamente. A diminuição da produção de glicocorticóides resulta em elevação da secreção de ACTH, que estimula a zona fasciculada a produzir esteróides proximais ao bloqueio. Uma grande proporção destes esteróides é excretada na urina como tetra-hidro metabólitos do 11-desoxicortisol. O diagnóstico da deficiência de 11 \Rightarrow OH é estabelecido por meio do teste de estímulo com ACTH exógeno. Portanto, o diagnóstico da forma clássica da deficiência da 11 \Rightarrow OH é feito pela constatação de níveis elevados, basais ou estimulados pelo ACTH, de três hormônios principais, 11-desoxicortisol e DOC séricos e tetra-hidrodessoxicortisol metabólitos urinários. A atividade da renina plasmática é marcadamente suprimida devido à ação agonista de mineralocorticóides da DOC. Embora na maioria dos casos clássicos os pacientes devam apresentar os valores basais de 11-desoxicortisol e DOC séricos e tetra-hidrodessoxicortisol metabólitos urinários elevados, alguns pacientes apresentam somente a elevação seletiva de um desses hormônios. O diagnóstico da forma não-clássica da deficiência da 11 \Rightarrow OH deve ser suscitado em pacientes com hirsutismo e/ou oligomenorréia hiperandrogênica, usando o critério de elevação do 11-desoxicortisol em pelo menos 3 vezes dos valores máximos obtidos pelo percentil 95% da popu-

lação após estímulo com ACTH exógeno (86,87). No entanto, a eficácia deste critério tem sido questionada, uma vez que, usado para triagem de pacientes com esta forma da deficiência de 11 \Rightarrow OH, selecionou 2 entre 260 mulheres com hiperandrogenismo e em nenhuma das duas foi possível a identificação de mutações no gene *CYP11B1* (85).

O diagnóstico da forma clássica pode ser complicado por diversos fatores e pode não ser realizado no período neonatal devido à ausência de hipertensão e à presença de atividade de renina supressa. Outra fonte de erro diagnóstico é a presença de discreta elevação dos níveis de 17OH-progesterona e, como os níveis de 11-desoxicortisol e DOC não são frequentemente mensurados, o diagnóstico errôneo de deficiência de 21-OH é geralmente realizado (30,84).

A tabela 2 descreve os achados bioquímicos dos pacientes com deficiência de 11 \Rightarrow OH estudados. Os valores de cortisol basal em geral foram baixos ou encontravam-se dentro da faixa de valores normais, ao passo que os valores de ACTH apresentaram-se muito acima da normalidade, assim como os dos compostos androgênicos plasmáticos testosterona, sulfato de desidroepiandrosterona. Devemos ressaltar os valores basais extremamente elevados de 11-desoxicortisol, o que foi fundamental para a definição do diagnóstico de deficiência de 11 \Rightarrow OH, tornando desnecessários os valores após o teste com ACTH. Ainda, os valores para 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) basais se mostraram aumentados, porém não se equiparam aos valores que caracterizam a forma clássica de deficiência de 21-OH. Muitas vezes a dosagem de 11-desoxicortisol não é realizada de imediato, porém a virilização ao nascimento, os valores elevados dos andrógenos plas-

Tabela 2. Dosagens hormonais dos pacientes brasileiros portadores da deficiência da 11 \Rightarrow hidroxilase forma clássica que tiveram avaliação molecular.

	Pacientes							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Cortisol (4-16 μ g/dL)	6,4	15	7,3	3	7,4	4	6,7	3,1
ACTH (10-50pg/dL)	365	—	—	—	170	—	300	—
Testosterona (< 10ng/dL)	110	1180	160	74	224	62	235	59,3
DHEAS (< 30 μ g/dL)	44	708	316	175	132	100	54	4,6
Androstenediona (20-100ng/dL)	430	340	520	440	800	940	1880	435
17 \Rightarrow OHP (10-200ng/dL)	503	330	70	470	460	130	312	312
11-Desoxicortisol (1,35 \pm 0,61mmol/L)	174	198	40	108	130	55	162	284

máticos associados aos valores pouco aumentados de 17-OHP devem ser sugestivos da deficiência de 11 \Rightarrow OH. Nesse caso, a dosagem de 11-desoxicortisol é imprescindível e deve ser solicitada.

TRATAMENTO

Reposição de glicocorticóides: a administração de glicocorticóides repõe a secreção deficiente de cortisol, reduz a secreção de ACTH, suprimindo a secreção excessiva de andrógenos, prevenindo a progressão da virilização. A supressão de ACTH também diminui a secreção dos precursores da aldosterona com efeito agonista de mineralocorticóides e melhora, desta forma, a hipertensão arterial. Hidrocortisona oral (10-20mg/m²/dia) dividida em 2 tomadas foi a droga utilizada em alguns dos nossos pacientes. Alguns outros utilizaram acetato de cortisona na dose de 25mg/dia divididas em 2 tomadas. Em pacientes adultos com maturação das epífises ósseas, glicocorticóides de maior meia vida, como a prednisona ou a dexametasona, podem ser utilizados. Como na deficiência de 21-OH, em situações de estresse ou infecção, a dose deve ser aumentada por alguns dias. Em situações de grandes procedimentos ou risco de morte, altas doses de hidrocortisona (100mg/m²/dia) via endovenosa devem ser administradas a cada 6 horas.

A terapêutica deve ser monitorizada periodicamente pela avaliação do crescimento linear, avaliação da idade óssea, e o aparecimento de adrenarca prematura. No tratamento inadequado, a hipertensão persistirá, a atividade de renina plasmática continuará supressa e os níveis de 11-desoxicortisol, DOC estarão elevados. A avaliação bioquímica pode ser mais facilmente realizada pela dosagem da androstenediona. Tratamento excessivo levará a características de síndrome de Cushing, com retardo de crescimento.

Tratamento anti-hipertensivo: se a hipertensão é

de longo tempo, antes do diagnóstico, terapêutica adjuvante com drogas anti-hipertensivas pode ser necessária para completa normalização da pressão arterial. Doses pequenas de espironolactona ou amiloride podem corrigir a hipocalemia e tratar hipertensão leve. Entretanto, às vezes há necessidade de associar bloqueadores de canais de cálcio. Inibidores de enzima conversora geralmente não melhoram a retenção de sódio e a hipertensão desse pacientes. Bloqueadores beta adrenérgicos também não são indicados nesta situação clínica, pois sua ação é dependente da redução da secreção de renina, que estará supressa nesta condição (30).

Correção da genitália ambígua: a reconstrução da genitália ambígua nas pacientes do sexo feminino é geralmente realizada em dois tempos, no primeiro, antes do segundo ano de vida, o cirurgião realiza a correção da genitália externa, e, em um segundo tempo, na puberdade tardia, realiza-se a vaginoplastia, mais proximamente do início da vida sexual da paciente. Psicoterapia, fazendo parte de um atendimento multi-profissional, também está geralmente indicada.

Diagnóstico-pré-natal: a principal complicação da HCA por deficiência de 11 \Rightarrow OH é a virilização intra-útero da genitália externa de fetos femininos afetados, assim como ocorre nas formas clássicas de deficiência de 21-OH. O diagnóstico pré-natal vem sendo utilizado em gestações de risco, isto é, de mães que já possuem uma criança com a forma clássica da doença, com o objetivo de suprimir a adrenal fetal e evitar a virilização da genitália externa em fetos femininos afetados. Nas doses usualmente utilizadas para o tratamento pré-natal de 21-OH (20 μ g/Kg/dia em doses fracionadas), as meninas com deficiência de 11 \Rightarrow OH tratadas nascem com genitália externa normal ou ligeiramente virilizada, não necessitando de cirurgia plástica. Entretanto, a terapêutica pré-natal ainda é controversa, pois ainda não existem dados com relação

à puberdade, estatura final e perfil psicológico das crianças submetidas ao tratamento. O consenso adotado hoje em dia é que os benefícios da terapia pré-natal suplantam os riscos, porém este tratamento deve ser empregado apenas em hospitais-escola.

REFERÊNCIAS

1. Rainey WE. Adrenal zonation: clues from 11 β -hydroxylase and aldosterone synthase. **Mol Cell Endocrinol** **1999**;151(1-2):151-60.
2. Waterman MR, Simpson ER. Regulation of steroid hydroxylase gene expression is multifactorial in nature. **Recent Prog Horm Res** **1989**;45:533-63.
3. Quinn SJ, Williams GH. Regulation of aldosterone secretion. **Annu Rev Physiol** **1988**;50:409-26.
4. Domalik LJ, Chaplin DD, Kirkman MS, Wu RC, Liu WW, Howard TA, et al. Different isozymes of mouse 11 β -hydroxylase produce mineralocorticoids and glucocorticoids. **Mol Endocrinol** **1991**;5(12):1853-61.
5. Ogishima T, Suzuki H, Hata J, Mitani F, Ishimura Y. Zone-specific expression of aldosterone synthase cytochrome P-450 and cytochrome P-450 β 11 in rat adrenal cortex: histochemical basis for the functional zonation. **Endocrinology** **1992**;130(5):2971-7.
6. Pascoe L, Jeunemaitre X, Lebrethon MC, Curnow KM, Gomez-Sanchez CE, Gasc JM, et al. Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism and adrenal tumors occurring in a single French pedigree. **J Clin Invest** **1995**;96(5):2236-46.
7. Kirita S, Morohashi K-I, Hashimoto T, Yoshioka H, Fujii-Kuriyama Y, Omura T. Expression of two kinds of cytochrome P-450(11 β) mRNA in bovine adrenal cortex. **J Biochem** **1988**;104:683-6.
8. Nonaka Y, Matsukawa N, Ying Z, Ogihara T, Okamoto M. Molecular nature of aldosterone synthase, a member of cytochrome P-450 β 11 family. **Endocr Res** **1991**;17:151-63.
9. Müller J, Schmid C, Boni-Schnetzler M, Lauber M. Two forms of cytochrome P450 β 11 in rat glomerulosa cells – a short review. **Endocr Rev** **1991**;17:165-84.
10. Okamoto M, Nonaka Y, Ohta M, Takemori H, Krishna Halder S, Zhi-Nong W, et al. Cytochrome P450(11 \Rightarrow): structure-function relationship of the enzyme and its involvement in blood pressure regulation. **J Steroid Biochem Molec Biol** **1995**;53:89-94.
11. Erdmann B, Denner K, Gerst H, Lenz D, Bernhardt R. Human adrenal CYP11B1: localization by *in situ*-hybridization and functional expression in cell cultures. **Endocr Res** **1995**;21:425-35.
12. Young LS, Murphy G, Kelly SN, Smith TP, Cunningham SK, Joseph McKenna T. Differential production of adrenal steroids by purified cells of the human adrenal cortex is relative rather than absolute. **Eur J Endocrinol** **2003**;148(1):139-45.
13. Mornet E, Dupont J, Vitte A, White PC. Characterization of two genes encoding human steroid 11 \Rightarrow hydroxylase (P450(11 β)). **J Biol Chem** **1989**;264:20961-7.
14. Kawamoto T, Mitsuuchi Y, Ohnishi T, Ichikawa Y, Yokoyama Y, Sumimoto H, et al. Cloning and expression of a cDNA for human cytochrome P-450 β 11 as related to primary aldosteronism. **Biochem Biophys Res Comm** **1990**;173:309-16.
15. Belkina NV, Lisurek M, Ivanov AS, Bernhardt R. Modelling of three-dimensional structures of cytochromes P450 11B1 and 11B2. **J Inorg Biochem** **2001**;87(4):197-207.
16. Bernhardt R. Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species. **Rev Physiol Biochem Pharmacol** **1996**;127:137-221.
17. Hanukoglu I, Gutfinger T. cDNA sequence of adrenodoxin reductase. Identification of NADP-binding sites in oxidoreductases. **Eur J Biochem** **1989**;180(2):479-84.
18. Lambeth JD, Seybert DW, Kamin H. Ionic effects on adrenal steroidogenic electron transport. The role of adrenodoxin as an electron shuttle. **J Biol Chem** **1979**;254(15):7255-64.
19. Wada A, Waterman MR. Identification by site-directed mutagenesis of two lysine residues in cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 that are essential for adrenodoxin binding. **J Biol Chem** **1992**;267(32):22877-82.
20. Lepesheva GI, Azeva TN, Strushkevich NV, Gilep AA, Usanov SA. Site-directed mutagenesis of cytochrome P450 β 11A1. Effect of lysine residue substitution on its structural and functional properties. **Biochemistry (Mosc)** **2000**;65(12):1409-18.
21. Azeva TN, Gilep AA, Lepesheva GI, Strushkevich NV, Usanov SA. Site-directed mutagenesis of cytochrome P450 β 11A1. II. Effect of replacement of the Arg425 and Arg426 residues on the structural and functional properties of the cytochrome P450 β 11A1. **Biochemistry (Mosc)** **2001**;66(5):564-75.
22. Beckert V, Bernhardt R. Specific aspects of electron transfer from adrenodoxin to cytochromes p450 β 11A1 and p450 β 11B1. **J Biol Chem** **1997**;272(8):4883-8.
23. Cosme J, Johnson EF. Engineering microsomal cytochrome P450 2C5 to be a soluble, monomeric enzyme. Mutations that alter aggregation, phospholipid dependence of catalysis, and membrane binding. **J Biol Chem** **2000**;275(4):2545-53.
24. Williams PA, Cosme J, Sridhar V, Johnson EF, McRee DE. Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. **Mol Cell** **2000**;5(1):121-31.
25. Williams PA, Cosme J, Ward A, Angove HC, Matak Vinkovic D, Jhoti H. Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. **Nature** **2003**;424(6947):464-8.
26. Lisurek M, Bernhardt R. Modulation of aldosterone and cortisol synthesis on the molecular level. **Mol Cell Endocrinol** **2004**;215(1-2):149-59.
27. Poulos TL. Modeling of mammalian P450s on basis of P450cam X-ray structure. **Methods Enzymol** **1991**;206:11-30.
28. Ravichandran KG, Boddupalli SS, Haseremann CA, Peterson JA, Deisenhofer J. Crystal structure of hemoprotein domain of P450 β 11A1, a prototype for microsomal P450's. **Science** **1993**;261(5122):731-6.

29. White PC. Genetic diseases of steroid metabolism. **Vitam Horm** 1994;49:131-95.
30. White PC, Curnow KM, Pascoe L. Disorders of steroid 11beta-hydroxylase isozymes. **Endocr Rev** 1994;15:421-38.
31. Fisher A, Friel EC, Bernhardt R, Gomez-Sanchez C, Connell JM, Fraser R, et al. Effects of 18-hydroxylated steroids on corticosteroid production by human aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86(9):4326-9.
32. Denner K, Vogel R, Schmalix W, Doehmer J, Bernhardt R. Cloning and stable expression of the human mitochondrial cytochrome P45011B1 cDNA in V79 Chinese hamster cells and their application for testing of potential inhibitors. **Pharmacogenetics** 1995;5(2):89-96.
33. Imai T, Yamazaki T, Kominami S. Kinetic studies on bovine cytochrome P45011 beta catalyzing successive reactions from deoxycorticosterone to aldosterone. **Biochemistry** 1998;37(22):8097-104.
34. Curnow KM, Mulatero P, Emeric-Blanchouin N, Aupetit-Faisant B, Corvol P, Pascoe L. The amino acid substitutions Ser288Gly and Val320Ala convert the cortisol producing enzyme, CYP11B1, into an aldosterone producing enzyme. **Nat Struct Biol** 1997;4(1):32-5.
35. Böttner B, Denner K, Bernhardt R. Conferring aldosterone synthesis to human CYP11B1 by replacing key amino acid residues with CYP11B2-specific ones. **Eur J Biochem** 1998;252(3):458-66.
36. Fisher A, Fraser R, McConnell J, Davies E. Amino acid residue 147 of human aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase plays a key role in 11beta-hydroxylation. **J Clin Endocrinol Metab** 2000;85(3):1261-6.
37. Bechtel S, Belkina N, Bernhardt R. The effect of amino acid substitutions I112P, D147E and K152N in CYP11B2 on the catalytic activities of the enzyme. **Eur J Biochem** 2002;269(4):1118-27.
38. Curnow MK, Tusie-Luna MT, Pascoe L, Natarajan R, Gu J-L, Nadler JL, et al. The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. **Mol Endocrinol** 1991;5:1513-22.
39. Taymans SE, Pack S, Pak E, Torpy DJ, Zhuang Z, Stratakis CA. Human CYP11B2 (aldosterone synthase) maps to chromosome 8q24.3. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83(3):1033-6.
40. Strachan T. Molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia. **Trends Endocr** 1989;32:68-72.
41. Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y. Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. **Proc Natl Acad Sci USA** 1986;83(9):2841-5.
42. Mitani F, Ogishima T, Miyamoto H, Ishimura Y. Localization of P450Aldo and P45011 \Rightarrow in normal and regenerating rat adrenal cortex. **Endocr Res** 1995;21:413-23.
43. Chua SC, Szabo P, Vittek A, Grzeschik KH, John M, White PC. Cloning of cDNA encoding Steroid 11beta-hydroxylase (P450c11). **Proc Natl Acad Sci USA** 1987;84:7193-7.
44. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. **Cell** 2001;104(4):545-56.
45. White PC. Steroid 11 beta-hydroxylase deficiency and related disorders. **Endocrinol Metab Clin North Am** 2001;30(1):61-79.
46. Ferrari P. Genetics of the mineralocorticoid system in primary hypertension. **Curr Hypertens Rep** 2002;4(1):18-24.
47. Curnow KM, Slutsker L, Vittek J, Cole T, Speiser PW, New MI, et al. Mutations in CYP11B1 causing congenital adrenal hyperplasia and hypertension cluster in exons 6,7 and 8. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993;90:4552-6.
48. White PC, Slutsker L. Haplotype analysis of CYP11B2. **Endocr Res** 1995;21:437-42.
49. White PC. Defects in cortisol metabolism causing low-renin hypertension. **Endocr Res** 1991;17:85-107.
50. Mitsuuchi Y, Kawamoto T, Rösler A, Naiki Y, Miyahara K, Toda K. Congenitally defective aldosterone biosynthesis in humans: the involvement of point mutations of the P450c18 gene (CYP11B2) in CMOII deficient patients. **Biochem Biophys Res Commun** 1992;182:974-9.
51. Pascoe L, Curnow KM, Slutsker L, Connell LMC, Speiser PW, New MI, et al. Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism results from hybrid genes created by unequal crossovers between CYP11B1 and CYP11B2. **Proc Natl Acad Sci USA** 1992;89:8327-31.
52. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Gutkin M, Fallo F, et al. Hereditary hypertension caused by chimeric gene duplications and ectopic expression of aldosterone synthase. **Nature Genet** 1992;2:66-74.
53. Helmborg A. Twin genes and endocrine disease: CYP21 and CYP11B genes. **Acta Endocrinol (Copenh)** 1993;129(2):97-108.
54. MacConnachie AA, Kelly KF, McNamara A, Loughlin S, Gates LJ, Inglis GC, et al. Rapid diagnosis and identification of cross-over sites in patients with glucocorticoid remediable aldosteronism. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83(12):4328-31.
55. Hampf M, Dao NT, Hoan NT, Bernhardt R. Unequal crossing-over between aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase genes causes congenital adrenal hyperplasia. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86:4445-52.
56. Portrat S, Mulatero P, Curnow KM, Chaussain JL, Morel Y, Pascoe L. Deletion hybrid genes, due to unequal crossing over between CYP11B1 (11beta-hydroxylase) and CYP11B2 (aldosterone synthase) cause steroid 11beta-hydroxylase deficiency and congenital adrenal hyperplasia. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86:3197-201.
57. White PC, Dupont B, New MI, Leiberman E, Hochberg Z, Rösler A. A mutation in CYP11B1 (Arg-448 \Rightarrow His) associated with steroid 11 \Rightarrow hydroxylase deficiency in Jews of Moroccan origin. **J Clin Invest** 1991;87:1664-7.
58. Helmborg A, Ausserer B, Kofler R. Frame shift by insertion of 2 basepairs in codon 394 of CYP11B1 causes congenital adrenal hyperplasia due to steroid 11 \Rightarrow hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1992;75:1278-81.
59. Naiki Y, Kawamoto T, Mitsuuchi Y, Miyahara K, Toda K, Orii T, et al. A nonsense mutation (TGG (Trp116) \Rightarrow TAG

- (Stop)) in CYP11B1 causes steroid 11 β -hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** **1993**;77:166-82.
60. Skinner CA, Rumsby G. Steroid 11 β -hydroxylase deficiency caused by a five base pair duplication in the CYP11B1 gene. **Hum Mol Genet** **1994**;3:377-8.
61. Nakagawa Y, Yamada M, Ogawa H, Igarashi Y. Missense mutation in CYP11B1 (CGA(Arg-384) - GGA (Gly)) causes steroid 11 β -hydroxylase deficiency. **Eur J Endocrinol** **1995**;132:286-9.
62. Geley S, Kapelari K, Johrer K, Peter M, Glatz J, Vierhapper H, et al. CYP11B1 mutations causing congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** **1996**;81:2896-901.
63. Rosler A, Cohen H. Absence of steroid biosynthetic defects in heterozygote individuals for classic 11 β -hydroxylase deficiency due to a R448H mutation in the CYP11B1 gene. **J Clin Endocrinol Metab** **1995**;80:3771-3.
64. Zachmann M, Tassinari D, Prader A. Clinical and biochemical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. A study of 25 patients. **J Clin Endocrinol Metab** **1983**;56:222-9.
65. Rösler A, Leiberman E, Cohen T. High frequency of congenital adrenal hyperplasia (classic 11 β -hydroxylase deficiency) among Jews from Morocco. **Am J Med Genet** **1992**;42:827-34.
66. Al-Jurayyan N. Congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency in Saudi Arabia: clinical and biochemical characteristics. **Acta Paediatr** **1995**;84:651-4.
67. Rösler A, White PC. Mutations in human 11 β -hydroxylase genes: 11 β -hydroxylase deficiency in jews of Morocco and corticosterone methyl-oxidase II deficiency in jews of Iran. **J Steroid Biochem Molec Biol** **1993**;45:99-106.
68. Merke DP, Tajima T, Chhabra A, Barnes K, Mancilla E, Baron J, et al. Novel CYP11B1 mutations in congenital adrenal hyperplasia due to steroid 11 β -hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** **1998**;83:270-3.
69. de Carvalho CE, Penachioni JY, Castro M, Moreira AC, de Mello MP. CYP11B1 intragenic polymorphisms give evidences for a different q356x allele in an African-Brazilian patient. **J Endocrine Genetics** **1999**;1:79-86.
70. Penachioni JY, de Carvalho CE, Castro M, Moreira AC, Kater CE, Mendonça BB, et al. Efeito fundador da mutação q356x no gene CYP11B1 em pacientes com deficiência de 11-beta hidroxilase. **Gen Mol Biol** **1999**;22:200.
71. Cooper DN, Youssoufian H. The CpG dinucleotide and human disease. **Hum Genet** **1988**;78:151-5.
72. Penachioni JY, Bachega TASS, Mendonça BB, Castro M, Moreira AC, de Mello MP. Descrição de uma nova mutação no éxon 8 do gene CYP11B1 em uma paciente com deficiência de 11-beta-hidroxilase. **Gen Mol Biol** **2000**;23:591.
72. Skinner CA, Rumsby G, Honour JW. Single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis for the detection of mutations in the CYP11B1 gene. **J Clin Endocrinol Metab** **1996**;81:2389-93.
74. Chabre O, Portrat-Doyen S, Vivier J, Morel Y, Defaye G. Two novel mutations in splice donor sites of CYP11B1 in congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. **Endocr Res** **2000**;26:797-801.
75. de Mello MP, Penachioni JY, Castro M, Bachega TASS, Mendonça BB. A novel mutation (G267S) on the CYP11B1 gene in a patient with 11 β -hydroxylase deficiency causing complete virilization. **Pediatric Research** **2001**;49:119A.
76. Harinarayan CV, Ammini AC, Karmarkar MG, Prakash V, Gupta R, Taneja N, et al. Congenital adrenal hyperplasia and complete masculinization masquerading as sexual precocity and cryptorchidism. **Indian Pediatr** **1992**;29(1):103-6.
77. Bistrizer T, Sack J, Eshkol A, Zur H, Katznelson D. Sex reassignment in a girl with 11 β -hydroxylase deficiency. **Isr J Med Sci** **1984**;20(1):55-8.
78. Laue L, Rennert OM. Congenital adrenal hyperplasia: molecular genetics and alternative approaches to treatment. **Adv Pediatr** **1995**;42:113-43.
79. Zachmann M, Tassinari D, Prader A. Clinical and biochemical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. A study of 25 patients. **J Clin Endocrinol Metab** **1983**;56:222-9.
80. Levine LS, Rauh W, Gottesdiener K, Chow D, Gunczler P, Rapaport R, et al. New studies of the 11 β -hydroxylase and 18 β -hydroxylase enzymes in the hypertensive form of congenital adrenal hyperplasia. **J Clin Endocrinol Metab** **1980**;50:258-63.
81. Rosler A, Leiberman E, Sack J, Landau H, Benderly A, Moses SW, et al. Clinical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. **Horm Res** **1982**;16(3):133-41.
82. Huma Z, Boulad F, Black P, Heller G, Sklar C. Growth in children after bone marrow transplantation for acute leukemia. **Blood** **1995**;86(2):819-24.
83. Mimouni M, Kaufman H, Roitman A, Morag C, Sadan N. Hypertension in a neonate with 11 β -hydroxylase deficiency. **Eur J Pediatr** **1985**;143(3):231-3.
84. Clark P. Nonclassic 11 β -hydroxylase deficiency: report of two patients and review. **J Ped Endocrinol Metab** **2000**;13:105-9.
85. Joehrer K, Geley S, Strasser-Wozak EM, Azziz R, Wollmann HA, Schmitt K, et al. CYP11B1 mutations causing non-classic adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. **Hum Mol Genet** **1997**;6(11):1829-34.
86. Carmina E, Malizia G, Pagano M, Janni A. Prevalence of late-onset 11 β -hydroxylase deficiency in hirsute patients. **J Endocrinol Invest** **1988**;11(8):595-8.
87. Azziz R, Boots LR, Parker CR Jr, Bradley E Jr, Zacur HA. 11 β -hydroxylase deficiency in hyperandrogenism. **Fertil Steril** **1991**;55(4):733-41.

Endereço para correspondência:

Maricilda Palandi de Mello
CBMEG-UNICAMP
Caixa Postal 6010
13083-875 Campinas, SP
Fax: (19) 3788-1089
e-mail: mmello@unicamp.br