

RESUMO

Hiperplasia adrenal congênita (HAC) é uma doença autossômica recessiva decorrente da alteração de enzimas que participam da síntese do cortisol. As manifestações podem ser causadas pela deficiência do cortisol e, em alguns casos, aldosterona e pelo acúmulo de precursores. O objetivo desta revisão é apresentar os mecanismos moleculares dos principais defeitos enzimáticos envolvidos na etiopatogênese da HAC. A deficiência da 21-hidroxilase (21OH) ocorre em 95% dos casos de HAC. Existem dois genes que codificam o P450c21: um ativo, *CYP21*, e um pseudogene *CYP21P*. Ambos são altamente homólogos (98%), o que favorece o emparelhamento desigual dos cromossomos homólogos durante a meiose, levando a duplicações e/ou deleções ou conversões desses genes. Adicionalmente, foram também descritas mutações de ponto, muitas delas presentes no pseudogene sugerindo microconversões. Mutações no gene *CYP11B1* causam HAC por deficiência da 11 β -hidroxilase, forma esta que corresponde a 5% dos casos. Algumas mutações são recorrentes, situando-se principalmente entre os exons 6-8 que representaria uma área *hot-spot* no gene *CYP11B1*. A deficiência de 17-hidroxilase é causada por mutações no gene *CYP17*, que codificam uma proteína alterada, levando a deficiência total ou parcial de 17-hidroxilação e 17,20-liase ou deficiência isolada de 17,20-liase. Finalmente, deficiência de 3 β -HSD é causada por mutações no gene *HSD3B2*, que codifica a enzima 3 β -HSD tipo II e estas mutações têm sido associadas tanto com a forma clássica como com a forma não clássica da deficiência da 3 β -HSD. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2002;46/4:457-477**)

Descritores: Hiperplasia adrenal congênita; Deficiência de 21-hidroxilase; Deficiência de 11 β -hidroxilase; Deficiência de 17-hidroxilase; Deficiência de 3 β -HSD

ABSTRACT

Molecular Bases of Congenital Adrenal Hyperplasia.

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is a recessive autosomal disease caused by inherited defects in cortisol biosynthesis. The manifestations are caused both by the deficient synthesis of cortisol, and sometimes of aldosterone, and by accumulation of the precursor steroids. The objective of this review is to present the molecular mechanisms of the main enzymatic defects involved in the etiopathogenesis of CAH. Deficiency of 21-hydroxylase (21OH) accounts for more than 95% of all cases of CAH. The human genome contains two *CYP* genes: one active, *CYP21*, and a pseudogene, *CYP21P*. Both are highly homologous (98%), facilitating recombination events during meiosis, leading to duplication and/or deletion or conversion of these genes. Additionally, point mutations have also been described. Deficiency of 11 β -hydroxylase (11 β OH) is caused by mutations in the *CYP11B1* gene, and accounts for 5% of all cases. Some mutations are recurrent, and mainly located on exons 6-8, which is considered a hot-spot area in *CYP11B1* gene. Deficiency of 17 α -hydroxylase (17OH) is caused by mutations in the *CYP17* gene, producing a truncated or impaired protein. These mutations have been described in patients with combined defi-

Maricilda Pallandi de Mello
Tânia A.S.S. Bachega
Marivânia da Costa-Santos
Livia Mara Mermejo
Margaret de Castro

Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) – UNICAMP (MPM), Campinas, SP; Laboratório de Hormônios e Genética Molecular, Disciplina de Endocrinologia, Hospital das Clínicas – FMUSP (TASSB); Universidade Federal de São Paulo -UNIFESP/EPM (MC-S), São Paulo, SP; e Divisão de Endocrinologia, Departamento de Clínica Médica - FMRP-USP (LMM, MC), Ribeirão Preto, SP.

Recebido em 29/07/2002
Aceito em 02/08/2002

ciencies of 17OH and 17,20-lyase or with isolated 17,20-lyase. Finally, CAH caused by 3 β -HSD deficiency is the consequence of mutations in the gene *HSD3B2* that encodes 3 β -HSD type II. In the classical form of the disease nonsense mutations, insertion and deletions have been described, while in non classical forms, mutations result in diminished enzyme affinity and loss of enzyme activity. (Arq Bras Endocrinol Metab 2002;46/4: 457-477)

Keywords: Congenital adrenal hyperplasia; 21-hydroxylase deficiency; 11 β -hydroxylase deficiency; 17-hydroxylase deficiency; 3 β -HSD deficiency

HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA POR DEFICIÊNCIA DA 21-HIDROXILASE

A HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA (HAC) por deficiência da 21-hidroxilase (21OH) é o mais freqüente dos defeitos enzimáticos adrenais, ocorrendo em 95% dos casos de HAC (1). A enzima 21OH participa da síntese dos glico e dos mineralocorticóides. Sua ação é converter a progesterona em desoxicorticosterona (DOC) e a 17OH-progesterona (17OHP) em 11-desoxicortisol (S), que por sua vez é convertido em cortisol sob ação da 11-hidroxilase (11OH). A redução da atividade da 21OH com decorrente diminuição da síntese de cortisol resulta em estimulação crônica do córtex adrenal pelo ACTH com hiperplasia adrenal e superprodução dos precursores do cortisol. Estes precursores são desviados para a biossíntese dos andrógenos, que não necessita da atividade da 21OH, causando os sinais de virilização característicos em indivíduos com esta deficiência enzimática.

Tradicionalmente é classificada em duas formas clínicas: clássica, que inclui os subgrupos perdedora de sal e virilizante simples; e não clássica, que inclui os subgrupos sintomática e assintomática (ou críptica). A forma virilizante simples caracteriza-se por graus variados de virilização pré-natal da genitália externa no sexo feminino e virilização pós-natal em ambos os sexos, com aumento do clitóris ou pênis, pubarca precoce e avanço da idade óssea com prejuízo na estatura final. A forma perdedora de sal, além da hiperprodução androgênica da forma anterior, apresenta deficiência mais severa na produção de aldosterona levando à desidratação com hiponatremia e hiperpotassemia nos primeiros 30 dias de vida que, se não tratada, resulta em choque e óbito. A forma de início tardio sintomática não apresenta virilização pré-natal e os sintomas iniciam-se em épocas variáveis, resultando em pubarca precoce, amenorréia primária ou secundária, hirsutismo, acne e infertilidade. A forma não clássica assintomática apresenta o mesmo

perfil hormonal da forma sintomática, porém sem manifestações clínicas, sendo geralmente diagnosticada na investigação dos familiares de um paciente (2).

Os programas de rastreamento neonatais sugerem uma freqüência da forma clássica em 1:5.000 a 1:15.000 nascimentos na maioria das populações caucasianas, enquanto que a forma não clássica ocorre aproximadamente em 1 a 2% da população geral (3,4). Estas formas não representam diferentes doenças, mas um contínuo espectro na severidade da deficiência da 21OH.

Genética Molecular

A 21-hidroxilação é mediada por uma enzima mitocondrial específica denominada P450c21; seu gene codificador está localizado no locus do complexo principal de histocompatibilidade humana no braço curto do cromossomo 6, 6p21, especificamente dentro do locus do HLA classe III (5). Devido à íntima relação da 21OH com os genes do complexo HLA, observou-se que indivíduos afetados de uma mesma irmandade eram quase que invariavelmente HLA idênticos (6). Por esta razão, antes do advento da clonagem do gene da 21OH, a tipagem do HLA foi muito utilizada no diagnóstico pré-natal das gestações de risco.

Não existe um haplótipo que seja diagnóstico de uma forma clínica específica da deficiência da 21OH. Entretanto, algumas correlações podem ser feitas: o HLA-Bw47; DR7 está presente em 20% a 25% dos alelos da forma clássica e o HLA-B14; DR1 está presente em 70% dos alelos da forma não clássica, principalmente em judeus do leste europeu (7,8). Essas combinações recebem o nome de haplótipos. Posteriormente, com a clonagem dos genes da 21OH foram descobertas as mutações que esses haplótipos carregavam.

Existem dois genes para o P450c21, um pseudogene *CYP21P* e um gene ativo *CYP21*. Ambos contêm 10 exons, suas seqüências são 98% idênticas nos exons e 96% idênticas nos introns (9). O *CYP21P* é um pseudogene porque não codifica uma proteína devido à presença de várias mutações, sendo as mais comuns: deleção de 8 pares de bases no exon 3, inserção de T no exon 7 (as quais geram uma alteração na matriz de leitura), e uma substituição de C por T no exon 8 (que cria um "codon" prematuro de parada da leitura). O gene *CYP21* codifica uma proteína com 494 aminoácidos.

Os genes *CYP21* e *CYP21P* se estendem sobre uma região de aproximadamente 30Kb, adjacentes e alternando com os genes *C4A* e *C4B* que codificam o quarto componente do complemento sérico (5,10). Recentemente foram descobertos outros pares de genes *XA*, *XB*, *YA*, *YB*, *ZA* e *ZB* (figura 1) (11). Os genes *XA* e *XB* sobrepõem-se ao último exon do

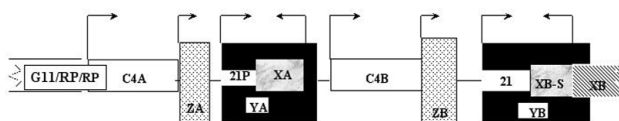


Figura 1. Diagrama da região C4/CYP21/TN-X no braço curto do cromossomo 6. As setas indicam o sentido da transcrição.

CYP21P e *CYP21* respectivamente. Estes genes são transcritos em sentido oposto aos genes da 21OH e XB codifica uma importante matriz protéica extracelular. Os genes YA e YB superpõem-se aos genes *CYP21P* e *CYP21* e o YA usa o promotor do *CYP21P*, sugerindo que o pseudogene possa ter alguma função no córtex adrenal. Os genes ZA e ZB apresentam transcritos adrenais, mas como os dos genes YA e YB, suas funções ainda não são conhecidas. Esta região de genes duplicados C4A-ZA-CYP21P-XA-YA; C4B-ZB-CYP21-XB-YB apresenta um extremo grau de identidade de nucleotídeos e favorece o emparelhamento desigual dos cromossomos homólogos durante a meiose, o que pode levar ao aparecimento de duplicações e/ou deleções desses genes.

A técnica de *Southern blotting* seguida de hibridação com sonda específica permite a verificação do número de cópias de um gene. Através desta metodologia podemos pesquisar a deleção do gene *CYP21*, que foi a primeira mutação descrita responsável pela deficiência da 21OH. Em decorrência de um emparelhamento desigual dos cromossomos durante a meiose, ocorre a formação de um alelo com duplicação da unidade C4B-CYP21 e outro com perda desta unidade, que é o alelo responsável pela HAC-21OH (10,12) (figura 2). Em 98,2% dos casos a deleção compreende 30Kb estendendo-se de algum ponto entre os exons 3 e 8 do *CYP21P*, através do C4B até o ponto correspondente no *CYP21*. Assim, o alelo resultante é um híbrido onde a porção 5' apresenta a seqüência do *CYP21P* e seu extremo 3' a seqüência do *CYP21*. Estima-se que as deleções do gene *CYP21* ocorram em 25% dos alelos nas formas perdedoras de sal em diversas populações caucasianas e do oeste europeu. Baixa freqüência de deleções têm sido restritas a populações específicas tais como: nas populações mexicana e japonesa com freqüência <2%, na população argentina com freqüência de 7% (13-15). No Brasil, onde a maioria da população tem ascendência portuguesa e casamentos interraciais com negros e índios são freqüentes, também observamos uma freqüência baixa de deleções, da ordem de 4% e de 7% em dois estudos populacionais (16,17).

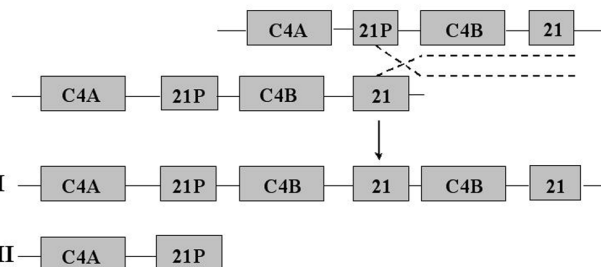


Figura 2. Esquema de *crossing-over* desigual durante a meiose entre os genes C4 e CYP21, gerando um alelo com duplicação do C4B e CYP21 (I) e outro alelo com deleção do C4B e CYP21 (II).

A segunda mutação descrita na HAC-21OH foi a conversão gênica, que também ocorre por um emparelhamento desigual dos genes durante a meiose. Neste caso ocorre a troca de somente uma fita de DNA entre os genes *CYP21* e *CYP21P*, transferindo seqüências deletérias do pseudogene para o gene ativo (18) (figura 3). A freqüência das conversões varia de 10 a 15% entre as diversas populações, estando presente principalmente na forma clássica (tabela 1). Na população brasileira sua freqüência foi de 17% em estudo que incluiu pacientes com a forma clássica (16) e de 7% em estudo que incluiu as três formas clínicas da HAC-21OH (17). A freqüência menor de mutações do tipo grandes rearranjos na nossa população sugere freqüência maior das mutações de ponto.

São descritas também deleções e duplicações do pseudogene envolvendo principalmente o gene C4B, os quais aparecem também na população normal, não sendo portanto causa da doença. Estes rearranjos são considerados como pré-mutação, por facilitar o emparelhamento desigual dos genes durante a meiose. Estudos populacionais demonstraram que em 65 a 90% dos alelos estudados em pacientes com HAC-21OH não foram evidenciadas as grandes mutações do tipo deleção do *CYP21* e conversão gênica, indicando que deveria existir outro tipo de alteração responsável pela patologia.

Através do seqüenciamento destes genes e posteriores estudos de atividade enzimática *in vitro* evidenciou-se a presença de mutações de ponto, que quando em homozigose ou heterozigose composta poderiam ser responsáveis pela deficiência da 21OH (19). Atualmente estas mutações podem ser facilmente identificadas através de técnicas de rastreamento como hibridação oligo-específica (20) ou reação de polimerização em cadeia (PCR) alelo-específico (21).

Foram descritas mais de 40 mutações de ponto responsáveis pela deficiência da 21OH (22). Destas, 9 são as mais freqüentes nas diversas populações estu-

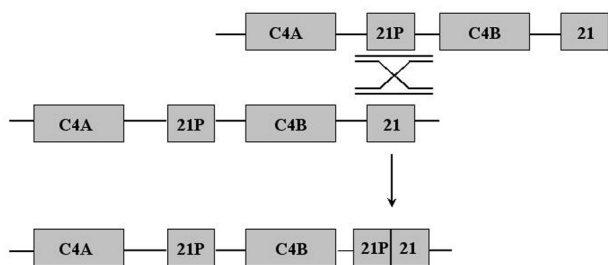


Figura 3. Esquema de emparelhamento desigual durante a meiose entre CYP21P e CYP21 ocorrendo troca de apenas um fio da molécula de DNA, transferindo seqüências deletérias do pseudogene para o CYP21.

Tabela 1. Frequência (%) dos grandes rearranjos no gene CYP21 em diversas populações.

País	Alelos (n)	Deleção CYP21	Conversão
Inglaterra*	40		22,5**
França	182	18,0	7,7
Estados Unidos	158	19,0	5,0
Japão*	46	2,2	4,3
Suécia	186		29,8**
Argentina	72	7	11
México	106	<1	
Brazil*UNICAMP	41	7,3	17,1
Brazil USP	186	4,0	7

* Apenas forma clássica, **% de conversões e deleções
Dados obtidos das referências 25, 26.

dadas (tabela 2) e estão presentes normalmente no pseudogene, sugerindo que foram transferidas para o gene ativo através de eventos de microconversões, devidas ao emparelhamento desigual destes genes durante a meiose (23,24).

A substituição de uma adenina por guanina no nucleotídeo 668 do intron 2 constitui a mutação mais freqüente causadora da deficiência da 21OH. Esta mutação cria um novo sinal de término do intron e 19 nucleotídeos que deveriam ser retirados são retidos no RNAm alterando toda a rede de leitura, impedindo a síntese de uma proteína ativa. Ocorre entre 26 a 42% dos alelos de indivíduos afetados por HAC. A maioria dos pacientes homo ou hemizigotos para esta mutação tem a forma perdedora de sal. Ocasionalmente, a apresentação da perda de sal pode ser retardada para alguns meses de vida nos portadores desta mutação. Em um paciente de nossa amostra, homozigoto para esta mutação, a primeira crise ocorreu com seis meses de vida.

A deleção de 8 pares de bases no exon 3 leva também a uma alteração na rede de leitura e codifica uma enzima completamente ineficiente, sendo encontrada em 3 a 10% dos alelos das formas perdedoras de sal.

Um grupo de 3 mutações ocorre ao mesmo tempo (*cluster*) no exon 6 nos codons 236, 237 e 239 e causa a substituição de 3 aminoácidos: Ile, Val, Met → Asn, Glu, Lis, respectivamente. Confere grave deficiência enzimática estando portanto mais associada à forma perdedora de sal. Ocorre com uma freqüência de 3 a 17% entre todos os alelos.

A mutação Q318X é devida a uma substituição de citosina por timina, cria um codon prematuro de parada de leitura e gera uma proteína truncada que é inefetiva. Ocorre em 4 a 7% dos alelos da forma perdedora de sal.

A mutação R356W decorrente de uma substituição de citosina por guanina altera a ligação da enzima com o substrato e ocorre em 14% dos alelos.

A mutação I172N resulta de uma substituição de timina por adenina, originando a troca de um aminoácido polar por um não polar e interrompendo a ligação da enzima com o retículo endoplasmático. A atividade da enzima ao redor de 3% permite que seja produzida uma pequena quantidade de aldosterona, suficiente para impedir a crise de perda de sal, o que faz com que esta mutação esteja associada à forma virilizante simples. Apresenta-se numa freqüência de 5 a 10% dos alelos afetados.

Dois mutações de menor gravidade, P30L e V281L, estão mais associadas à forma de início tardio. A mutação P30L no exon 1 ocorre devido à troca de uma citosina por uma timina e está presente em 17% dos alelos nas formas de início tardio. A mutação V281L é devida a uma substituição de guanina por timina causando uma troca conservativa de aminoácidos, o que origina uma mudança na conformação da proteína, reduzindo sua atividade enzimática. Sua freqüência nas formas de início tardio associada ao HLA-B14 varia de 78 a 84% dos alelos. A mutação P30L em geral tem expressão clínica mais grave do que a mutação V281L, todas as nossas pacientes portadoras desta mutação apresentaram clitoromegalia.

A tabela 3 apresenta dados referentes às mutações de ponto em diversas populações. A freqüência das mutações de ponto em dois estudos populacionais brasileiros foi semelhante (25,26). As mutações mais freqüentes foram I2 splice, I172N e V281L e estiveram associadas significativamente com as formas perdedora de sal, virilizante simples e não clássica respectivamente ($p < 0,01$) (25). Em geral as freqüências descritas em outros estudos não diferem das nossas, poucos casos onde diferenças foram observadas podem refletir variações individuais da amostra ou diferenças populacionais (26).

Tabela 2. Mutações de ponto mais freqüentes no gene *CYP21*, localização e atividade enzimática.

Mutação	Localização	Atividade (%)	Presença no pseudogene	Forma Clínica
Pro30Leu	exon 1	30-60	Sim	NC
I2 splice	ínton 2	mínima	Sim	PS/VS
del 8pb	exon 3	0	Sim	PS
Ile172Asn	exon 4	3-7	Sim	VS
Cluster	exon 6	0	Sim	PS
Val281Leu	exon 7	20-50	Sim	NC
Inserção de T	exon 7	0	Sim	PS
Gli318stop	exon 8	0	Sim	PS
Arg356Trp	exon 8	2	Sim	PS/VS
Pro453Ser	exon 10	20-50	Sim	NC

PS: forma perdedora de sal, VS: forma virilizante simples, NC: forma não clássica

Tabela 3. Freqüência (%) das mutações de ponto no gene *CYP21* em diversas populações.

Países	Alelos N	P30L exon 1	I 2 sp intron 2	Del 8bp exon 3	I172N exon 4	Cluster exon 6	V281L Exon 7	ins T exon 7	Q318X Exon 8	356W exon 8
França	182	**	20	7	4	11	15	1	**	**
Estados Unidos	158	2,5	26	10	16	6,3	8,9	2,5	5,7	7,5
Japão*	46	**	37	**	24	**	**	**	19,5	6,5
Suécia	186	1,6	30,5	1,2	21	1,1	7	0,5	3,2	4,3
Argentina	72	**	18	2,7	15,3	0	**	**	13,8	5,5
Brasil* UNICAMP	74	**	24,7	1,4	19	0	4,1	5,8	11,3	8,2
Brasil USP	228	2,7	18,3	2,7	15	0,5	14,5%	**	4,8	8,6

*só forma clássica; **não estudado; Dados obtidos das referências 25,26.

O gene *CYP21* pode ser convertido em grandes segmentos do pseudogene contendo duas ou mais mutações de ponto, ou ainda, um mesmo alelo pode receber eventos diferentes de microconversão ao longo das gerações. Em nossa amostra, 6% dos alelos apresentaram duas ou três mutações de ponto. Por este motivo, recomenda-se, para adequado diagnóstico molecular, pesquisar no mínimo as nove mutações de ponto derivadas do pseudogene em todos os pacientes. Também é importante a segregação das mutações no DNA dos pais. Além de caracterizar a distribuição das mutações por alelo, permite diferenciar homozigose de hemizigose (indivíduos que têm uma mutação de ponto em um alelo e deleção no outro alelo).

A pesquisa dos grandes rearranjos e das 9 mutações de ponto mais freqüentes são responsáveis por 80 a 85% dos alelos na população brasileira (25,26). Os demais alelos devem apresentar mutações novas, as quais não foram identificadas por terem sido empregadas técnicas de estudo dirigidas para mutações específicas. Estudos de seqüenciamento do gene *CYP21* têm identificado mutações novas nas diferentes populações (22). De forma geral as mutações novas não estão presentes no pseudogene e representam eventos mutagênicos casuais, sendo descritas em casos isolados.

Na população brasileira foram identificadas as mutações G424S e H28+C (27,28). A mutação G424S foi identificada em 7 pacientes portadores da forma virilizante simples, em desequilíbrio de ligação com o HLA-DR17 e deleção dos genes *CYP21P* e *C4A*. A presença do mesmo haplótipo em todos os portadores da mutação sugere uma origem comum ou seja, efeito de gene fundador.

A mutação H28+C foi identificada em homozigose em uma menina portadora da forma perdedora de sal. Ocorreu a inserção de um nucleotídeo C no codon 28, levando a uma alteração de toda a rede de leitura e a formação de uma parada prematura de leitura no codon 78, gerando uma proteína truncada. Ambas mutações não foram encontradas no estudo do pseudogene, sugerindo que não são provenientes de eventos de microconversão. Outras mutações novas em pacientes brasileiros estão em estudo quanto à possibilidade de gene fundador. Como a nossa população apresenta grau alto de miscigenação, é provável que estas sejam identificadas também em outras populações.

Estudos de seqüenciamento complementando as técnicas anteriores identificaram mutações em 100% dos alelos da forma clássica, enquanto que a forma não clássica, em nossa amostra, permanece ainda com fre-

qüência alta (23%) de alelos sem mutações identificadas (29). Nenhum paciente portador de forma não clássica e com valor da 17OHP pós-ACTH <17ng/mL teve seu genótipo definido. Em outros estudos populacionais, onde significativo número de pacientes com a forma não clássica foi estudado, esta forma clínica também apresenta porcentagem alta de alelos sem mutações identificadas. Estes dados sugerem que o atual critério diagnóstico desta forma clínica, 17OHP >10ng/mL, possa estar superestimando o seu diagnóstico (30).

Para investigar esta possibilidade, foi realizado o estudo de 59 heterozigotos obrigatórios quanto à presença de manifestações hiperandrogênicas, valores da 17OHP pós-ACTH e pesquisa de mutações no gene *CYP21*. Manifestações hiperandrogênicas foram encontradas em 10% dos heterozigotos, em frequência semelhante à da população normal. Identificamos dois indivíduos sem manifestações hiperandrogênicas e com valores da 17OHP pós-ACTH de 11 e de 15ng/mL, os quais são valores diagnósticos da forma não clássica da 21OH. Para afastar a possibilidade de serem afetados pela forma não clássica assintomática, foi realizado o seqüenciamento do gene *CYP21* destes indivíduos, e confirmou-se a presença de apenas uma mutação em heterozigose, Q318X e G424S, respectivamente. Observa-se que existe uma superposição dos valores da 17OHP pós-ACTH entre os indivíduos heterozigotos para mutações com severo comprometimento da atividade enzimática e os portadores da forma não clássica (31). Assim, como heterozigose para a 21OH não causa manifestações hiperandrogênicas, sugerimos que estes pacientes não devem ser tratados com glicocorticóide. O estudo molecular do gene *CYP21* está indicado para se diferenciar heterozigose de forma não clássica da 21OH nos indivíduos com manifestações hiperandrogênicas e com valores da 17OHP pós-ACTH entre 10 e 17ng/mL.

Correlação do Genótipo com Fenótipo

Os estudos de mutagênese *in vitro* permitiram quantificar a redução da atividade enzimática conferida por cada mutação (19,32) e sua correlação com as diferentes formas clínicas da doença. Speiser e cols. (20) dividiram as mutações em três grupos de acordo com a gravidade do comprometimento da atividade enzimática e correlacionaram com as diferentes formas clínicas. O grupo A (severo comprometimento) incluiu mutações com atividade enzimática ausente ou mínima. O grupo B (moderado comprometimento) incluiu a mutação I172N que confere entre 3 a 7% de ati-

vidade enzimática. O grupo C (leve comprometimento) incluiu as mutações P30L e V281L, as quais conferem atividade enzimática > 18%.

A HAC-21OH é uma doença com herança autossômica recessiva causada por várias mutações que estão presentes com frequência alta na população. Por este motivo, os indivíduos afetados apresentam geralmente mutações diferentes em cada um dos alelos (heterozigotos compostos) e uma minoria são homozigotos para uma mutação. A forma clínica no heterozigoto composto é conferida pelo alelo com maior atividade enzimática. Assim, indivíduos com o genótipo severo/severo apresentam, principalmente, a forma perdedora de sal, com os genótipos severo/moderado e moderado/moderado apresentam, principalmente, a forma virilizante simples e os com os genótipos severo/leve, moderado/leve e leve/leve apresentam, principalmente, a forma não clássica.

Existe boa correlação do genótipo com o fenótipo. Em amostra de 93 pacientes com deficiência da 21-hidroxilase foi observado 62% de correlação do genótipo severo/severo com a forma perdedora de sal. Isto porque 60% dos pacientes deste grupo possuíam a mutação I2 splice em pelo menos um alelo. Estudos *in vitro* da mutação do I2 splice demonstram *splicing* alternativos resultando em níveis variados de 21-hidroxilase normal, o que explicaria sua associação também com a forma virilizante simples (19). Houve 96% de correlação dos genótipos severo/moderado e moderado/moderado com a forma virilizante simples e 88% de correlação dos genótipos severo/leve, moderado/leve e leve/leve com a forma não clássica. Estas correlações também ocorreram de forma estatisticamente significativa com os valores hormonais basais da 17OH-progesterona e da testosterona, os quais se traduziram no grau de virilização da genitália externa (25).

Estudos de correlação do genótipo com o fenótipo (20,21,33) verificaram que nem sempre ocorre a associação esperada. Os fatores que podem ser responsáveis por esta disparidade são a presença de mutações raras no mesmo alelo, bem como atividade de 21-hidroxilação extra-adrenal mediada por outras enzimas além da P450c21. Outros fatores que podem ser responsáveis por esta ausência de correlação e que devem ser estudados são anormalidades em regiões promotoras e regulatórias do gene *CYP21*, atividade de fatores de transcrição e de proteínas transportadoras.

A deficiência da 21-hidroxilase é uma doença que apresenta um complexo mecanismo molecular, por apresentar um gene ativo e um pseudogene altamente homólogos, localizados em uma região de genes duplicados que favorece eventos mutagênicos.

Entretanto, apresenta bem elucidado seu mecanismo fisiológico e os conhecimentos de biologia molecular num futuro próximo poderão ser direcionados para a terapia gênica. Já foi realizado estudo com terapia gênica em camundongos com completa ausência da atividade da 21-hidroxilase e esta possibilitou restauração da capacidade de secreção de cortisol durante 40 dias (34). Mas, até o momento, na prática clínica são consolidadas as seguintes aplicações do estudo molecular do gene *CYP21*: 1) aconselhamento genético; 2) diagnóstico pré-natal das gestações de risco para a forma clássica; 3) na diferenciação entre heterozigose de forma não clássica da 21-hidroxilase; 4) em parceiro de paciente com as diferentes formas clínicas para se determinar a probabilidade de terem filhos afetados com a forma clássica.

Diagnóstico Prenatal

A principal complicação da HAC-21OH é a virilização intra-útero da genitália externa de fetos femininos afetados. O diagnóstico pré-natal vem sendo utilizado há duas décadas em gestações de risco, isto é, de mães que já possuem uma criança com a forma clássica da deficiência da 21-hidroxilase, com o objetivo de instituir a terapêutica a fim de suprimir a adrenal fetal e evitar a virilização da genitália externa em fetos femininos afetados. Inicialmente o diagnóstico pré-natal foi realizado através de determinações da 17OH-progesterona ou da tipagem do HLA a partir da 15^a semana de gestação (35,36). Entretanto estas metodologias ocasionalmente forneciam resultados falso negativos, nas formas clínicas de menor gravidade quando se utilizava a dosagem hormonal (37) ou mesmo na tipagem do HLA por eventos de recombinação intra-HLA. O inconveniente destes testes que utilizam a amniocentese é que são realizados tardiamente, somente a partir da 15^a semana de gestação, quando já pode ter ocorrido a virilização da genitália externa.

O aprimoramento das técnicas de identificação das mutações responsáveis pela deficiência da 21-hidroxilase associado à metodologia de biópsia de vilos coriônicas permitiu sua aplicação clínica em testes de diagnóstico pré-natal, melhorando a sensibilidade e precocidade diagnóstica. A extração de DNA obtido de tecido de vilos coriônicos possibilitou o diagnóstico genético a partir da 10^a semana de gestação, tornando possível a intervenção terapêutica. Como a diferenciação da genitália pode iniciar-se antes da 10^a semana de gestação, o tratamento deve ser iniciado assim que se confirmar a gestação (4^a a 5^a semana).

O protocolo de tratamento pré-natal seguido mundialmente consiste em orientar as mães de risco

para procurar o médico com uma a duas semanas de atraso menstrual. Após a confirmação da gestação, pelo β hCG positivo, deve ser iniciada a terapia com dexametasona, na dose de 20 μ g/Kg/dia, dividida em três vezes. A partir da 10^a a 12^a semana de gestação realiza-se a biópsia de vilos coriônicos para análise da determinação do sexo e estudo dos genes *CYP21*. Em caso de sexo masculino não há risco de problemas na genitália e a terapia deve ser suspensa. Em caso de sexo feminino prossegue-se o tratamento e o estudo para determinação no feto das mutações presentes no caso índice. Se o feto apresentar mutações em ambos alelos deve-se continuar a terapêutica até o nascimento, caso contrário o tratamento é interrompido. Durante a gestação a supressão adrenal fetal deve ser avaliada periodicamente com dosagens de estriol urinário. Em caso de feto masculino sugere-se também a investigação das mutações, o que possibilitaria o início da terapêutica de reposição, nos casos afetados, logo após o nascimento, podendo-se evitar a crise de perda de sal. A figura 4 apresenta o diagrama da conduta diagnóstica e terapêutica em gestações de risco para a HAC -21OH.

A vantagem do diagnóstico através do estudo de vilosidade coriônica é a sua precocidade, o que permite interromper precocemente a exposição da mãe à dexametasona em caso do feto não afetado. Speiser e cols. (38), estudando 24 gestações de risco com técnicas gene-específicas como *Southern blotting*, PCR e hibridação alelo-específico para as 9 mutações de ponto mais frequentes, demonstraram serem estes métodos bastante eficientes, pois foram detectadas mutações em 95% dos cromossomos estudados com uma eficácia de 96% confirmada em exame pós-natal. Erro com o diagnóstico molecular ocorreu em 5%. Este erro

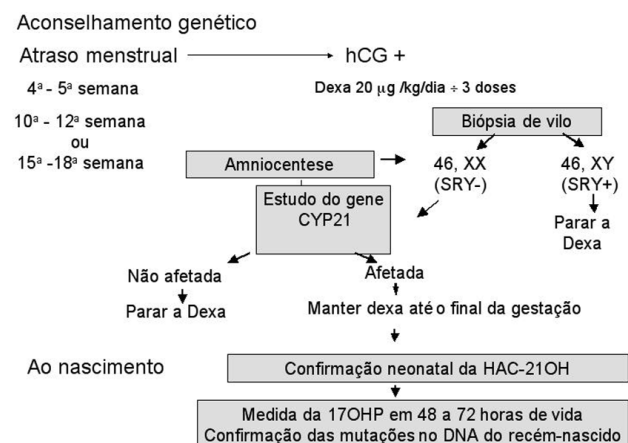


Figura 4. Diagrama da conduta diagnóstica e terapêutica em gestações de risco para a HAC -21OH.

pode ser decorrente de *cross*-contaminação das amostras se não for realizado rigoroso controle na execução da reação. Também pode ocorrer falha de amplificação de um alelo (*allelic dropout*) normal ou mutante durante a PCR. Para minimizar este problema, o estudo de microssatélites altamente polimórficos que flanqueiam o gene da 21-hidroxilase tem sido utilizado no diagnóstico pré-natal em adjunto ao estudo molecular do gene *CYP21* (39).

Aproximadamente 70% das meninas tratadas pré-natalmente nascem com genitália externa normal ou ligeiramente virilizada, não necessitando de cirurgia plástica. São descritas falhas da terapia, através de meninas que nasceram mais virilizadas necessitando de correção cirúrgica. As causas que poderiam contribuir para a falha da terapêutica pré-natal são: 1) início tardio da terapia; 2) dose inadequada de dexametasona; 3) interrupção da terapia no meio da gestação; 4) não aderência; 5) passagem transplacentária do glicocorticóide, que pode ser influenciada pela sua afinidade pela transcortina; e 6) a função esteroidogênica adrenal fetal pode não ser regulada somente pelo ACTH em fases precoces da gestação.

Não é referida na literatura a presença de complicações fetais decorrentes do tratamento com dexametasona. A incidência de abortos espontâneos foi igual à da população geral. Da mesma forma não foram encontradas alterações nos parâmetros antropométricos (altura, peso e perímetro cefálico ao nascimento); porém a maioria destas crianças ainda não alcançou a estatura final ou a idade puberal para conclusões finais serem estabelecidas. É observada uma frequência maior de abortos após a biópsia de vilos coriônicos, para evitar isto a biópsia deve ser realizada apenas por profissionais com experiência, entre a 10^a e 12^a semana de gestação (22).

Com relação às mães, em geral a terapia é bem tolerada sendo citadas complicações em 4 a 9% dos casos. Ocorrem queixas de ganho excessivo de peso apesar do uso de dieta hipocalórica e hipossódica. Também são referidas estrias violáceas, crescimento de pêlos em rosto, hiperglicemia, hipertensão e fácies cushingóide. A maioria dos efeitos colaterais desaparecem com a interrupção da terapia. O tratamento pré-natal deve ser considerado apenas para as mães sadias e estas devem ser cuidadosamente monitoradas quanto ao ganho de peso, pressão arterial e à tolerância à glicose (40).

No serviço de Endocrinologia da FMUSP foram acompanhadas 22 gestações de risco para a deficiência da 21-hidroxilase, sendo que dentre elas ocorreu um aborto no primeiro trimestre não relacionado à biópsia de vilos, 21 gestações chegaram a termo. No

momento do diagnóstico da gestação as mães iniciaram a terapêutica com dexametasona 20µg/kg/dia. Duas delas apresentaram excessivo ganho de peso nos primeiros 3 meses da gestação. Foi predito que em 11 gestações o feto era do sexo feminino, dentre elas três afetadas pela forma clássica e foi mantida a terapia pré-natal com dexametasona. Em todas o diagnóstico foi confirmado após o nascimento e as meninas nasceram com genitália externa normal, mostrando a eficácia do tratamento (41). Em 10 gestações foi predito que o feto era do sexo masculino, sendo um afetado pela forma perdedora de sal. A terapia pré-natal com dexametasona foi descontinuada e logo após o nascimento o diagnóstico foi confirmado, possibilitando a instituição da terapia com glicocorticóide e mineralocorticóide antes da crise de perda de sal.

A terapêutica pré-natal ainda é controversa. Por ser uma metodologia recente ainda não existem dados com relação à puberdade, estatura final e perfil psicológico das crianças submetidas ao tratamento. Somente um entre 8 fetos será uma menina afetada pela deficiência da 21-hidroxilase, sendo assim, sete gestações serão submetidas desnecessariamente ao tratamento com dexametasona, antes que seja determinado o sexo e o genótipo. Por outro lado, a terapia é importante porque permite a ocorrência de uma genitália externa normal evitando ou diminuindo o trauma cirúrgico, evitando erros de atribuição do sexo ao nascimento e ainda por evitar a ação excessiva de andrógenos no cérebro feminino fetal, que poderia ser responsável por um dimorfismo sexual cerebral fetal. Dados da literatura referem que meninas com deficiência da 21-hidroxilase se casam menos, têm menos filhos, têm menor interesse sexual e maior incidência de lesbianismo. Estas complicações podem ser resultado do *imprinting* de andrógenos no cérebro pré e/ou pós-natal, como também do trauma cirúrgico da genitoplastia.

O consenso adotado hoje em dia é que os benefícios da terapia pré-natal suplantam os riscos. Até que estas crianças submetidas ao tratamento com dexametasona pré-natal, afetadas ou não, atinjam a idade adulta e possam ser tomadas conclusões definitivas, este tratamento deve ser empregado apenas em hospitais-escola. As mães devem ser informadas sobre os potenciais riscos da terapia e também quanto à possibilidade da falta de benefícios.

Hiperplasia Congênita de Adrenal por Deficiência de 11β-Hidroxilase

A deficiência da 11β-hidroxilase (11β-OH) foi primeiramente relatada por Eberlein e Bongiovani em 1955. Na maioria dos países corresponde a no máximo

5% dos casos de hiperplasia congênita da adrenal, com freqüência em torno de 1:100.000 nascimentos (42). 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 (43) e pode chegar a mais de 25% dos casos de HCA na Arábia Saudita (44).

Na deficiência de 11 β -OH, além dos sinais de hiperandrogenismo, um sinal clínico importante é a hipertensão arterial com alcalose hipercalêmica devida ao excesso de produção de deoxicorticosterona (DOC), o que a distingue da deficiência da 21-OH. Entretanto a hipertensão arterial pode ou não estar presente e é observada em 30-60% dos casos (42,43). A hipertensão, muitas vezes, só se manifesta nas fases mais tardias da infância ou adolescência e é atribuída ao excesso de DOC. A perda de sal na deficiência de 11 β -OH pode ocorrer na infância, quando os níveis de DOC ainda são relativamente baixos e há maior vulnerabilidade à perda de sal. A perda de sal também pode ocorrer após o tratamento com glicocorticóides, que suprimem a DOC. O diagnóstico da forma clássica da deficiência da 11 β -OH é feito pela constatação de níveis basais elevados de três hormônios principais: 11-deoxicortisol sérico, DOC e da substância S-tetra-hidro-urinária (THS). Em alguns casos ocorre a deficiência da 11 β -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. O diagnóstico da forma não clássica da deficiência da 11 β -OH é baseado em elevação do 11-desoxicortisol em pelo menos 3 vezes os valores máximos obtidos pelo percentil 95% da população após estímulo com ACTH exógeno.

Genética Molecular

A enzima 11 β -OH é uma das enzimas da família do citocromo P-450 chamada CYP11. Em humanos há 2 isoenzimas, uma responsável pela síntese de cortisol e outra pela aldosterona. A CYP11B1 catalisa a conversão de 11-desoxicortisol a cortisol na camada fasciculada, demonstrada em estudos de cultura de células e por hibridização *in situ* (45), a CYP11B2, por sua vez, age na conversão de desoxicorticosterona (DOC) a corticosterona, 18-hidroxycorticosterona e aldosterona na camada glomerulosa (46-49).

Mutações no gene *CYP11B1*, que codifica a enzima 11 β -hidroxilase (11 β -OH), causam HCA, ao passo que as mutações no gene *CYP11B2*, que codifi-

ca a enzima CYP11B2, são as causas da deficiência de corticosterona metil oxidase ou deficiência da aldosterona sintase. Por outro lado, a síndrome conhecida como hiperaldosteronismo supressível por glicocorticóides é resultado de uma recombinação intergênica, justapondo-se o promotor do *CYP11B1* com seqüências codificadoras do *CYP11B2* formando um gene híbrido (50,51). Neste processo o gameta resultante apresenta o gene híbrido *CYP11B1/CYP11B2* intercalado aos genes *CYP11B2* e *CYP11B1*. Nesses casos uma questão que se levanta é porquê um alelo que possui três cópias gênicas, duas delas com estrutura molecular inalterada, estaria produzindo um fenótipo alterado devido a uma cópia gênica quimérica. O gameta com deleção no locus de *CYP11B*, gerado como produto recíproco no processo de cruzamento desigual, produzindo o híbrido *CYP11B2/CYP11B1* deve produzir a deficiência de 11 β -OH (52,53). Apenas recentemente foram descritos dois pacientes com deficiência de 11 β -OH apresentando deleções com a formação de genes quiméricos deste tipo (54,55). Mutações deletérias no gene *CYP11B1*, entretanto, são encontradas nas análises de DNA de pacientes com deficiência de 11 β -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 (52,56-62).

Algumas mutações são recorrentes, principalmente, em certos grupos étnicos com alto grau de endogamia (judeus iranianos e marroquinos), o que sugere um forte efeito fundador na origem e irradiação dos alelos mutantes (63). No Brasil a mutação Q356X foi a primeira a ser descrita em um paciente da raça negra (64). 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 (65). A mutação Q356X havia sido anteriormente descrita em pacientes americanos de origem africana (52,66). A tabela 4 resume as principais mutações descritas e suas prováveis ações na transcrição e ação catalítica da enzima.

Curiosamente, 15/36 das mutações deletérias para a hidroxilação em c11 da 11 β -OH estão situadas entre os exons 6-8 (52), formando um *cluster* de mutações no gene *CYP11B1*. Duas possibilidades têm sido levantadas para explicar essa concentração: mutações nessas regiões aconteceriam com a mesma freqüência que no resto dos exons, porém teriam maior probabilidade de serem deletérias na atividade enzimática, ou a região do cluster representaria uma

Tabela 4. Mutações mais frequentes no gene *CYP11B1*, localização e atividade enzimática.

Mutação	Tipo de Mutação	Efeito na Proteína	Referência
Q19X exon 1	nonsense: gCaa→Taa	proteína truncada não funcional	66
Δ 32 exon 1	frameshift: deleção 1 bp-	proteína anômala não funcional	52
P42S exon 1	missense: gCcc→Tcc	redução atividade enzimática (37%)	58
Δ 105-114 exon 2	frameshift: deleção 28bp	proteína anômala não funcional	
W116X exon 2	nonsense: tGg→tAg	proteína truncada não funcional	58
i121 exon 2	frameshift: inserção 5bp-	proteína anômala não funcional	59
V129M exon2	missense: gTg→Atg	atividade enzimática nula	61
N133H exon3	missense: Aat→Cat	redução atividade enzimática (15%)	72
K174X exon3	nonsense: Aag→Tag	proteína truncada não funcional	52
W247X exon 4	nonsense: tGg→tAg	proteína truncada não funcional	61
G267R exon 4	missense: cGgc→Cgc	alteração do sítio de splicing	70
G267S exon 4	missense: cGgc→Agc	alteração do sítio de splicing	69
G267D exon 5	missense: gGc→gAc	alteração do sítio de splicing	70
T318M exon 5	missense: aCg→aTg	altera sítio de transferência de	
T318R exon 5	missense: aCg→aGg	próton nas hidroxilações em c11	52
T318T exon 5	missense: acG→acC		66
			68
T319M exon 6	missense: aCg→aTg	redução atividade enzimática (17%)	72
A331V exon 6	missense: gCt→gTt	atividade enzimática nula	61
Q338X exon6	nonsense: Cag→Tag	proteína truncada não funcional	52
Q356X exon 6	nonsense: Cag→Tag	proteína truncada não funcional	52,66,64
E371G exon 6	missense: gAg→gGg	altera interação com a proteína oxi-redutora adrenodoxina	61
R374Q exon 6	missense: cGg→cAg	altera sítio de ligação à adrenotoxina (proteína oxi-redutora de P450c11)	52
R384Q exon 7	missense: cGa→cAa	altera sítio de ligação ao substrato (11-desoxicortisol)	52
R384G exon 7	missense: Cga→Gga	altera sítio de ligação ao substrato (11-desoxicortisol)	60
i394 exon 7	frameshift: inserção 2b	proteína anômala não funcional	57
i404 exon 8	frameshift: inserção 1 bp	proteína truncada não funcional	71
Y423X exon 8	nonsense: taTa→taG	proteína truncada não funcional	72
R427H exon 8	missense: cGc→cAc	altera ligação ao grupo heme	70
V441G exon 8	missense: gTg→gGg	altera estrutura secundária da região de ligação ao grupo heme	52
R448H exon 8	missense: cGc→cAc	altera sítio de ligação ao ferro do grupo não protéico heme.	56
R448C exon 8	missense: Cgc→Tgc	atividade enzimática nula	61
i464 exon 8	inserção ctg inframe	proteína anômala não funcional	61
C494F exon 9	missense: tGc→tTc	envolvida com a transferência de elétrons para o grupo heme	70

área *hot-spot* no gene de *CYP11B1*, estando por alguma razão mais susceptível a mutações. Na verdade, quatro das oito mutações pontuais mais frequentes (T318M, R374Q, R384Q e R448H) são transições CpG⇒TpG, sendo este o grupo de transições mais comuns nos eventos de mutações pontuais do genoma humano (67). Sugestivamente, 49% (23/49) dos dinucleotídeos CpG das regiões codificadoras de *CYP11B1* estão dentro da região que engloba os exon 6 ao 8. Se comparado ao genoma, em geral, que apresenta 1,5% de CpG (67), a região do *cluster* de mutações de *CYP11B1* apresenta uma porcentagem duas vezes maior (~3%) dessa composição nucleotídica, sugerindo que a alta taxa mutacional nessa região possa ser devida a uma área *hot-spot* (52). No entanto, o fato da região entre os exons 6–8 codificar domínios importantes para a ação enzimática, como o de ligação ao

substrato à adrenodoxina, entre os codons 362-367, e o de ligação ao grupo heme, entre os codons 443-463, reforça a primeira hipótese.

Outra característica interessante que se observa nesse quadro de mutações é a ocorrência de várias mutações em um mesmo codon. Os codons 384 e 448, por exemplo, apresentam duas mutações diferentes, respectivamente. Outros dois codons que parecem ser alvos de múltiplas mutações são os codons 267 e 318 que, coincidentemente, fazem parte da sequência consenso doadora de *splicing*, dos exons 4 e 5, respectivamente. Portanto, a expressão biológica de mutações nestes codons se deve mais a um processo de *splicing* anômalo do que a uma alteração na atividade enzimática causada por uma troca de aminoácido. Esta afirmação encontra respaldo em um trabalho publicado recentemente, no qual foi demonstrado que uma

mutação conservativa no codon 318 (T(ACG) a T(ACC)) provocou a eliminação dos exons 3-7 no mRNA isolado da glândula adrenal da paciente (68). Num estudo realizado no Brasil foi identificada uma terceira mutação no codon 267, que troca uma glicina por serina (69). O códon 267 é formado pelo último nucleotídeo do éxon 4 e pelos dois primeiros nucleotídeos do éxon 5. Portanto, duas mutações, G267S e G267R, resultam, respectivamente, da troca de G→A e G→C no último nucleotídeo do éxon 4. Por outro lado, a mutação G267D ocorre no primeiro nucleotídeo do éxon 5. Desta forma, além de provocarem a troca do aminoácido, ocorrem na seqüência consenso do sítio doador e aceptor de *splice* do íntron 4 e podem afetar o processo para a formação do RNAm (70). Uma nova mutação foi encontrada em uma paciente de origem árabe no Brasil. Trata-se da inserção de uma citosina no éxon 8; 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 aparece um códon de terminação (71). Considera-se que a proteína produzida a partir do gene mutado seja anômala e tenha, portanto, sua atividade enzimática comprometida.

Hiperplasia Adrenal Congênita por Deficiência de 17-Hidroxilase/17,20 liase

A deficiência de 17-hidroxilase (D17OH) foi descrita pela primeira vez em 1966 (73). A paciente com 27 anos, cariótipo 46XX, apresentava ausência de desenvolvimento puberal e hipertensão arterial, com níveis diminuídos de cortisol, aldosterona e potássio. Considerada uma doença muito rara, a D17OH é comumente reportada na literatura através de casos isolados. Sua incidência estimada é de 1:50.000 (74), provavelmente, 1% de todos os casos de hiperplasia adrenal congênita (HAC). O bloqueio enzimático da 17-hidroxilase impede a produção de cortisol pela zona fasciculada adrenal e o conseqüente aumento do ACTH estimula a hipersecreção dos precursores imediatos ao bloqueio enzimático, como progesterona, desoxicorticosterona (DOC) e corticosterona (B) e, também, de esteróides com secreção geralmente limitada como 18OH-B, 18OH-DOC e 19-nor-DOC (75). A ação mineralocorticoide exercida pela DOC é responsável pelos achados clínicos de hipertensão e hipocalemia, na presença de supressão do sistema renina-angiotensina-aldosterona. A deficiência dos esteróides gonadais, por sua vez, determina a ausência de desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários no paciente 46XX ou presença de pseudohermafroditismo masculino. Alguns aspectos relacionados à fisiopatolo-

gia da HAC por D17OH ainda não estão totalmente elucidados, como: 1) níveis elevados de aldosterona em alguns pacientes japoneses (76); 2) os possíveis casos de deficiência parcial da enzima, com genitália ambígua, menarca, níveis pressóricos ou de potássio dentro da normalidade; 3) definição clínica e laboratorial da deficiência isolada de 17,20 liase (77); e 4) a associação de achados fortuitos como restos de tecido adrenal em testículo (78), mielolipoma (79), adenoma adrenal (80), gônadas disgenéticas e desenvolvimento incompleto de ductos müllerianos (81).

Genética Molecular

Vinte anos após a descrição do primeiro paciente com D17OH, o gene *CYP17*, constituído por 13kb, 8 exons e 7 introns, foi mapeado no cromossomo 10q24-q25 (82) e, desde então, o entendimento das bases moleculares desta doença, de herança autossômica recessiva, tem se intensificado. Trinta e nove mutações que afetam o gene estrutural do citocromo P450c17 foram descritas na literatura (tabela 5). A maioria dessas mutações (56%) constitui-se por substituições simples de bases, que promovem a troca de um aminoácido ou introduzem um códon de parada de transcrição do RNAm. Doze deleções que afetam o gene *CYP17* (31% das mutações) promovem *frameshift*, com conseqüente expressão de uma proteína muito truncada. A maior mutação descrita no gene *CYP17* é uma extensa deleção que acomete três membros de uma mesma família italiana (83). A deleção de 518 pb associada à inserção de 469 pb de DNA não humano acomete o exon II, todo o intron II e parte do exon III. Dois outros pacientes italianos apresentam homozigose para deleção de 24 pb, excluindo os aminoácidos 70-77 (84). As demais mutações consistem em pequenas duplicações e ainda, duas mutações do tipo splice, que substituem G → T no intron 2 (85) e G → A no intron 7 (86), afetando o sítio doador para o *splice* do RNAm.

O gene *CYP17* humano é responsável pela codificação de uma única enzima - o citocromo P450c17, que exerce atividades de 17-hidroxilação e 17,20 liase nos tecidos adrenais e gônadas. Os seus fatores de transcrição ainda não foram totalmente elucidados. Baseando-se em estudos com roedores, possíveis sítios de interação com o SF-1 e com alguns receptores nucleares (COUP-TF, NGF-IB e fatores esteroideogênicos 1 e 2) (87), foram identificados na região promotora do gene *CYP17*. Experimentos com células adrenais Y1 de camundongo (88) demonstraram que as regiões -235/-184 e -184/-104 desempenham papel essencial na transcrição primária do gene e na sua expressão induzida por hormônio, respectivamente. Estudos

Tabela 5. Mutações no gene *CYP17*.

Nº	Nº de pacientes/ País de origem	Mutações	Exon/ Intron	Função de 17- hidroxilação	Função de 17,20	Referências
1	1 - Canadá	Dup 4 pb (480)	VIII	NS	NS 102	
2	1 - Japão	W17X	I	NS	NS	103
3	1 - Japão	Del F (53 ou 54)	I	< 37%	< 8%	104
4	1 - Japão	Dup 7 pb (120)	II	NS	NS	105
5	2 - Guamanian	S106P	II	Zero	Zero	106
6	3 - Itália	Del 518pb + Ins 469 pb	II - III	Zero ?	Zero ?	83
(7) e (8)	1 - Canadá	(7) R239X e (8) P342T	IV e VI	(7) Zero ? e (8) 40-45%	(7) Zero ? e (8) 40-45%	76
(9) e (10)	1 - Suíça	(9) Q461X e (10) R496C	VIII e VIII	(9) Traços e (10) 10%	(9) Traços e (10) 10 %	76
11	1 - Tailândia	Del 9 pb (487 - 489)	VIII	Zero	Zero	107
12	2 - Japão	Del TG (300 e 301)	V	NS	NS	108
(13) e (14)	1 - Caucásiano	(13) Y64S e (14) Dup 3pb (112)	I e II	(13) 15% e (14) Traços	?	109
(7) e (15)	1 - Reino Unido	(7) R239X e (15) E194X	IV e III	(15) Zero ?	(15) Zero ?	110
16	2 - Japão	H373L	VI	Zero	Zero	111
17	1 - Alemanha	R440H	VIII	Zero	Zero	99
18	1 - Caucásiano	G90D	I	NS	NS	100
19	1 - Japão	Del G (438)	VIII	Zero ?	Zero ?	112
20	2 - Canadá	R96W	I	4,1%	0,8%	113
21	1 - Japão	G_A (Intron 7)	Intron VII	Zero ?	Zero ?	85
22	1 - Brasil	R347H	VI	65%	< 5%	101
23	1 - Brasil	R358Q	VI	65%	< 5%	101
(24) e (25)	1 - Israel	(24) Del T (46) e (25) F417C	I e VIII	(24) Zero e (25) 26%	(24) Zero e (25) 0,70%	114
(2) e (26)	1 - Japão	(2) W17X e (26) G_T (Intron 2)	I e Intron II	(26) Zero ?	(26) Zero ?	86
27	1 - Japão	Del C (131)	I	Zero ?	Zero ?	115
28	1 - Japão	M1I	I	Zero	Zero	116
29	1 - Turquia	R35L	I	38%	33%	84
30	2 - Itália	Del 24 bp	I	< 1%	< 1%	84
(31) e (32)	1 - Turquia	(31) N177D e (32) R496H	III e VIII	(31) 10% e (32) 33%	(31) 10% e (32) 20%	84
33	1 - Itália	Del 3 pb (330 ou 331)	I	< 1%	< 1%	84
(3) e (34)	1 - Japão	(3) Del 3pb (53 ou 54) e (34) Y329X	I e VI	(3) 10% e (34) < 1%	(3) 12% e (34) < 1%	84
(11) e (35)	1 - China	(11) Del 9pb (487-489) e (35) P409R	VIII e VII	(35) 2,9%	(35) 4,9%	117
(36) e (37)	1 - Japão	(36) Del T (243) e (37) R415C	IV e VIII	(36) Zero e (37) 8%	(36) Zero e (37) 10%	118
(16) e (38)	1 - Japão	(16) H373L e (38) Del T (247)	VI e IV	(38) Zero	(38) Zero	119
39	2 - Itália	F93C	I	10%	10%	120

A numeração das mutações obedece à ordem cronológica de publicação em literatura indexada.

NS = Estudo de função enzimática não realizado.

Zero ? (estudo de função enzimática não realizado, provável ausência de atividade).

As mutações numeradas entre parênteses indicam os casos de heterozigose composta.

recentes com células humanas adrenais NCI-H295A comprovaram que os elementos Sp1 e Sp3 interagem com a região promotora do gene *CYP17*, especificamente nos sítios -227/-184, assim como as proteínas NF-1C, atuam em sítios mais proximais (-178/-152 e -107/-85), ambos exercendo papel essencial na transcrição do gene, na espécie humana (87). Entretanto, até o momento, não há relato de mutação que afete a região promotora do gene *CYP17* e apresente, por conseguinte, expressão clínica de D17OH.

O citocromo P450c17, codificado pelo gene *CYP17*, se localiza no retículo endoplasmático liso. O mesmo RNAm de 2.1kb se expressa tanto em adrenais como em gônadas (89) e codifica uma proteína constituída por 508 aminoácidos, peso molecular de 57kd. Os citocromos P-450 necessitam de ancoramento adequado à membrana microsomal, ligação de substrato, oxigênio e grupo heme, assim como transferência de elétrons, para o exercício adequado de suas funções. A ação do citocromo

P450c17 é modulada por vários fatores específicos: 1) o tipo de substrato disponível, interfere diretamente na eficiência de catálise da enzima; 2) o tecido alvo e a espécie animal; 3) a disponibilidade do citocromo b5 e adrenodoxina redutase (90); e 4) a transferência de elétrons na presença de fosforilação (84).

A 17-hidroxilação de pregnenolona e progesterona é realizada com a mesma eficiência metabólica pelo citocromo P450c17. Entretanto, a quebra do carbono na posição 17,20 é 50 vezes mais eficiente para a formação de DHEA do que androstenediona, e depende diretamente da ação do citocromo b5, como foi demonstrado em estudos realizados em diferentes tipos de células e organismos (91,92). O citocromo b5 atua como um cofator alostérico (91), ao contrário do citocromo adrenodoxina redutase que atua por transferência de elétrons. A presença do citocromo b5 tem a capacidade de aumentar em até 10 vezes a função de 17,20 liase, mas ainda mantém a preferência para

metabolização da via Δ^5 (93) que, por sua vez, tem importância vital na espécie humana, principalmente a partir dos 8 anos de idade com a elevação de DHEA e início da adrenarca. O citocromo P450c17 também exerce 16-hidroilação em 10% do substrato progesterona (92) e a partir da pregnenolona, catalisa a formação de 16-andieno, um precursor de ferormônios porcinos (94).

Zuber e cols. em 1986 expressaram, pela primeira vez, o DNA complementar do citocromo P450c17 bovino, em células não esteroidogênicas de rim de macaco (Cos 1) (95). Desde então, o estudo de atividade cinética do P450c17 humano tem sido realizado em células COS-1 (96), E.coli (93), nos microsomos extraídos de leveduras (91) e em tecidos humanos (81,92). Estes estudos permitem a comparação da atividade metabólica exercida pelas proteínas mutadas e pelo P450c17 *wild type* humano, na presença de substratos específicos marcados com radioisótopos. Existem três diferentes tipos de déficit enzimático (tabela 5): 1) deficiência total de 17-hidroilação e 17,20 liase; 2) deficiência parcial combinada de 17-hidroilação e 17,20-liase; ou 3) deficiência isolada de 17,20 liase.

Estudos com química computacional permitiram a criação de um modelo gráfico do P450c17 humano, a partir da estrutura -BMP de bactéria (92). A determinação da estrutura terciária da enzima, associada aos estudos de cinética, tem possibilitado um melhor entendimento de como as mutações afetam a ação do citocromo P450c17. A região carboxi terminal da proteína é essencial para a ligação apropriada dos substratos (94). Os últimos 48 resíduos formam parte da cobertura do anel β , essencial para ligação heme. Assim, as mutações 1, 9 e 11 (tabela 5) alteram a interação do substrato com a enzima. As mutações 21 e 26 promovem erro de *splice* durante o processo de transcrição do RNAm, com conseqüente deleção completa dos exons 2 e 7, e introdução de codons de parada prematuros, imediatamente antes da região de ligação heme. A mutação R440H (n. 17) e a deleção de um G na posição 438 (n. 19) são destituídas de qualquer atividade enzimática, devido o comprometimento do resíduo Cys na posição 442, essencial na doação do grupo sulfidril para a ligação heme. Os resíduos localizados na espiral B' e no anel β formam um "bolso" de ancoramento do substrato, de forma que as mutações n. 5,14,18 e 20 (tabela 5) provavelmente envolvem a interação de substrato como causa de déficit enzimático.

Recentemente o serviço de Endocrinologia da Universidade Federal de São Paulo fez um inquérito epidemiológico em centros de referência médica do

Brasil, abordando o número de pacientes afetados pelas diversas formas de HAC. Avaliamos 30 pacientes brasileiros com D17OH, cujo diagnóstico laboratorial foi devidamente confirmado através da elevação dos precursores DOC, B, 18OH-B e 18OH-DOC, nos tempos basais e após estímulo com ACTH (cortrosina, 250 μ g EV). Observamos que a deficiência de 11 β -hidroxilase não se mostrou mais prevalente do que a D17OH.(97) Dentre estes pacientes, analisamos do ponto de vista molecular, 24 pacientes pertencentes a 20 famílias (98). Este grupo apresenta mediana de idade cronológica de 16,6 anos (variação de 10,3 – 34 anos), quadro de hipertensão arterial com níveis médios de pressão sistólica de 152 \pm 23,2mmHg e de pressão diastólica de 105 \pm 14mmHg, além de hipocalemia (3,1 \pm 0,6mEq/l). Sete novas mutações foram identificadas (tabela 6) e não se encontram descritas nos países colonizadores ou com história de imigração para o Brasil.

O estudo da expressão dessas mutações, em células COS-1 e leveduras W303B (98), demonstrou total ausência de atividade enzimática, com exceção da mutação Y329D, que retém cerca de 5% de atividade de 17-hidroilação e 17,20 liase (tabela 6). Este achado é compatível com o fenótipo apresentado pela paciente, que desenvolveu caracteres sexuais secundários espontâneos (Tanner V) e ciclos menstruais irregulares. Dois pacientes brasileiros, homocigotos para as mutações R347H (99) e R358Q (100), possuem dados clínicos e achados laboratoriais compatíveis com deficiência isolada de 17,20-liase (101). O estudo dessas mutações confirmou a presença de neutralização de cargas positivas nestes aminoácidos, que comprometem a interação dos elementos redox, adrenodoxina redutase e citocromo b5, com o citocromo P40c17 (90).

Hiperplasia Adrenal Congênita por Deficiência da 3 β HSD

A hiperplasia adrenal congênita decorrente da deficiência da enzima 3 β hidroxiesteróide desidrogenase (3 β HSD) é uma doença autossômica recessiva rara, descrita em 1962 por Bongiovanni (121). O gene 3 β HSD encontra-se no cromossomo 1p13.1 (122) e possui 4 exons, 3 introns e uma região 5' flanqueadora. Os genes 3 β HSD do tipo 1 (*HSD3B1*) e do tipo 2 (*HSD3B2*) são os responsáveis pela codificação das isoenzimas 3 β HSD do tipo 1 e do tipo 2, que possuem 93,5% de homologia (122). A enzima 3 β HSD1 é expressa nos tecidos periféricos, principalmente na pele, glândulas mamárias e na placenta e a 3 β HSD2 é expressa na adrenal, nos testículos e ovário (123). A enzima 3 β HSD1 tem uma afinidade 10 vezes maior

Tabela 6. Mutações no gene *CYP17* em pacientes brasileiros .

n. Pacientes afetados /	Mutações	Exon/Intron	Função 17-Hidroxilação	Função 17,20 Liase	
11	W406R	Homozigoto	VII	Zero	Zero
7	R362C	Homozigoto	VI	Zero	Zero
2	W406R	Heterozigoto	VII	Zero	Zero
	R362C	Composto	VI	Zero	Zero
1	W406R	Heterozigoto	VII	Zero	Zero
	M1T	Composto	I	NS	NS
1	P428L	Homozigoto	VIII	Detectável	Detectável
1	Y329X*	Homozigoto	VI	Zero ?	Zero ?
1	Y329D	Heterozigoto	VI	5%	5%
	AG/CG Splice #	Composto	Intron 2	Zero	Zero
1	R347H	Homozigoto	VI	65%	< 5%
1	R358Q	Homozigoto	VI	65%	< 5%

NS = Estudo de função enzimática não realizado

Zero ? (estudo de função enzimática não realizado, provável ausência de atividade)

O codon de parada introduzido é TAG, enquanto na mutação 34 é TAA.

Mutação splice em região aceptora (posi o 2306).

pelo substrato do que a enzima 3β HSD2 e pode ser estimulada após um aumento na secre o de gonadotrofina resultante de baixos níveis de andrógenos circulantes (124,125). A enzima 3β HSD catalisa a conversão dos Δ^5 esteróides, tais como pregnenolona (Preg), 17-hidroxipregnenolona (17-Preg), deidroepiandrostenediona (DHEA) e androstenediol (Δ^5 -diol) em seus respectivos Δ^4 esteróides, a progesterona (P), 17-hidroxiprogesterona (17-OHP), androstenediona (Δ^4 -A) e testosterona (T) (123). Essa atividade enzimática é, portanto, de fundamental importância para a síntese de todas as classes de esteróides ativos (progesterona, mineralocorticóides, glicocorticóides, andrógenos e estrógenos). Em contraste com as altera es provocadas pela deficiência da 21-hidroxilase e da 11β -hidroxilase, em que a síntese de esteróides está prejudicada apenas no córtex adrenal, a deficiência da 3β HSD impede a síntese de esteróides tanto na adrenal como nas gônadas (124,126). Como a produ o de andr genios   diminuída, f tos do sexo masculino têm desenvolvimento incompleto da genitália externa com pseudo-hermafroditismo masculino, resultando em ambigüidade reconhecível ao nascimento. Recém-nascidos do sexo feminino, em geral, têm desenvolvimento normal da genitália externa ou apresentam sinais de viriliza o branda, como clitoromegalia, devido ao acúmulo de DHEA circulante e sua conversão, na periferia, para andrógenos mais potentes (124-126). Cerca de dois terços dos pacientes descritos com deficiência da 3β HSD são 46 XY, pois os recém-nascidos do sexo

feminino não apresentam altera es na genitália externa ao nascimento, dificultando o diagnóstico (125). Existem duas formas de HAC pela deficiência da 3β HSD: uma forma clássica, reconhecida ao nascimento, que pode ou não apresentar perda de sal e uma forma não clássica, de desenvolvimento mais tardio (127-129), a qual se caracteriza pelo aparecimento de pubarca precoce em crianças e hirsutismo, acne, irregularidades menstruais em mulheres adultas.

O diagnóstico bioquímico da forma clássica da deficiência da 3β HSD tem sido realizado com base nas concentra es elevadas dos esteróides Δ^5 como 17-Preg e DHEA e seus metabólitos na urina e no sangue (121). No entanto, as concentra es dos esteróides Δ^4 também podem estar aumentadas (125,127,130), provavelmente, devido à conversão dos esteróides Δ^5 em esteróides Δ^4 pela enzima 3β HSD1 nos tecidos periféricos. O diagnóstico bioquímico da forma não clássica ainda apresenta dificuldades e os critérios mais aceitos eram os critérios adotados por Pang e cols. (131). Estes critérios baseavam-se em níveis de 17-Preg e DHEA, após estímulo com ACTH exógeno, maiores ou iguais a dois desvios padrões da média (≥ 1639 ng/dL e ≥ 1818 ng/dL, respectivamente) comparados a controles com idade e est dio puberal semelhantes. As rela es 17-Preg/17-OHP e 17-Preg/cortisol (F), após estímulo com ACTH exógeno, maiores ou iguais a dois desvios padrões da média ($\geq 6,4$ e ≥ 52 , respectivamente), também auxiliavam no diagnóstico da forma não clássica. Entretanto, estudos de crianças

com pubarca precoce e mulheres hirsutas, cujas dosagens hormonais se enquadravam nos critérios acima, não apresentavam alterações moleculares compatíveis com a doença, sugerindo que esse critérios não distinguem pacientes com ou sem mutações no gene *HSD3B2*. Estes autores (132) e outros estudos recentes (133,134) têm demonstrado que os valores da 17-Preg e da relação 17-Preg/F, após estímulo com ACTH exógeno, muito acima de dois desvios padrões da média têm sido os parâmetros mais válidos para o diagnóstico da forma não clássica de HAC por deficiência da 3 β HSD. Marui e cols. (129), estudando crianças que apresentavam pubarca precoce, mostraram que as pacientes com mutação no gene *HSD3B2* apresentaram os níveis mais elevados de 17-Preg e da relação 17-Preg/F, após estímulo com ACTH, enquanto que houve sobreposição dos níveis de DHEA e das relações 17-Preg/17-OHP e DHEA/ Δ^4 -A entre as pacientes com e sem mutações. Esse trabalho sugere que a dosagem de 17-Preg e a relação 17-Preg/F, após estímulo com ACTH, são parâmetros importantes e fundamentais para o diagnóstico da forma não clássica da deficiência da 3 β HSD.

Mutações têm sido descritas no gene *HSD3B2* em pacientes com a forma clássica da deficiência da 3 β HSD. Recentemente, também foram identificadas mutações no gene *HSD3B2* na forma não clássica da doença, em meninas com pubarca precoce (129). Até hoje não foi identificada nenhuma mutação no gene *HSD3B1* (132). Assim como ocorre na deficiência da 21-hidroxilase, em que mutações diferentes resultam em uma grande heterogeneidade de manifestações clínicas, o mesmo tem sido observado na deficiência da 3 β HSD (125,128). Geralmente, na forma clássica da 3 β HSD com perda de sal, as mutações encontradas são mutações pontuais, em homozigose ou heterozigose composta, como *nonsense*, *frame-shift* ou *missense*, as quais abolem completamente a atividade da enzima 3 β HSD. Na forma clássica sem perda de sal, geralmente os pacientes estudados são homozigotos ou heterozigotos compostos para mutações *missense*, que mantêm até 10% da atividade enzimática quando esta é avaliada em estudos com células transfectadas em cultura (125). Como também se observa na 21-hidroxilase, uma atividade enzimática mínima é suficiente para sintetizar aldosterona e evitar a perda de sal e, na maioria dos pacientes, há correlação genótipo-fenótipo. Entretanto, existem exceções a essa regra, por exemplo, em pacientes que apresentam a forma não perdedora de sal foram identificadas mutações *missense* T259M

em homozigose (129,135) cujo estudo funcional da proteína mutada mostrou ausência de atividade enzimática (125). Foi descrito (125), também, um paciente com a forma não perdedora de sal da deficiência da 3 β HSD, portadora da mutação em heterozigose composta L236S / 867delG, em que o estudo funcional revelou 100% de atividade enzimática em células transfectadas com a mutação *missense* L236S e ausência de atividade enzimática em células contendo a mutação *frame-shift* 867delG.

O efeito das mutações no gene *HSD3B2* sobre as proteínas codificadas e, conseqüentemente, sobre o fenótipo da doença depende da região do gene em que essa mutação ocorre (125,126,130,134, 136, 137). Mutações que ocorrem em áreas do gene conservadas em todas as espécies de mamíferos e vertebrados são mais deletérias. Exemplo disso são as mutações Y254D e Y253N, as quais levam à perda completa da atividade enzimática, pois o resíduo tirosina é muito conservado entre as espécies e se localiza no provável sítio ativo da enzima, estando envolvido na atividade isomerase desta. As mutações A10E, A10V e G15D alteram um aminoácido na região altamente conservada Gly-X-X-Gly-X-X-Gly encontrada em todos os membros da superfamília 3 β HSD. No caso da mutação A10E, a alanina é conservada nos vertebrados e está localizada no provável domínio ligante de NAD, sendo que sua substituição provoca ausência de atividade enzimática na proteína mutada. Mais recentemente, o trabalho de Moisan e cols. (125) forneceu evidências de um novo mecanismo molecular para a deficiência da 3 β HSD, mostrando que algumas mutações, independentemente de sua localização no gene, provocam instabilidade na proteína, levando a uma perda na atividade enzimática. Estudos posteriores têm confirmado este achado (130,136,137). A tabela 7 mostra as mutações descritas em pacientes com HAC por deficiência da 3 β HSD.

A fisiopatologia, os critérios hormonais e a etiopatogenia da forma clássica da HAC por deficiência da 3 β HSD estão, atualmente, bem demonstrados e compreendidos. Porém, a forma não clássica, devido à heterogeneidade das manifestações clínicas e as dificuldades dos parâmetros bioquímicos, necessita de mais estudos para que estes parâmetros sejam completamente elucidados. O avanço das técnicas de biologia molecular tem possibilitado uma melhor compreensão da forma não clássica da HAC por deficiência da 3 β HSD, à medida que fornece um diagnóstico mais definitivo e permite uma melhor avaliação genótipo-fenótipo dessa doença.

Tabela 7. Correlação fenótipo-genótipo das mutações no gene *HSD3B2* descritas em pacientes com HAC por deficiência da β HSD.

Origem	Cariótipo	Idade ao diagnóstico	Fenótipo			Alelos mutantes	A. E. (%) [*]	Ref.	
			PS/NPS	GA	PP				PE
	46 XX		OS	não	sim	não	W171X / W171X	0**	124
	46 XY		OS	sim	não	sim	186insC187	0**	124
							W171X	0**	
Algeriana	46 XY	ao nascimento	OS	sim			P222Q / P222Q	0	125
	46 XX	1 mês	OS	sim					
Francesa	46 XY	ao nascimento	OS	sim			T259M	0	125
	46 XX	ao nascimento	OS	não			867delG	0**	
Sri-Lanka	46 XY	ao nascimento	PS	sim			687del27 / 687del27	0	125
Sri-Lanka	46 XY	ao nascimento	PS	sim			687del27 / 687del27	0	125
Americana	46 XY	1 semana	PS	sim			E142K	0	126
							W171X	0**	
Holandesa	46 XY	ao nascimento	PS	sim			Y253N	0	126
							186insC187	0**	
Franco-Canadense	46 XX	3 semanas	PS	não	não	sim	A10E / A10E	0	136
Franco-Canadense	46 XY	13 dias	PS	sim			A10E / A10E	0	136
Taiwan	46 XY	ao nascimento	PS	sim			T259M / T259M	0	137
Algeriana	46 XY	ao nascimento	PS	sim			G15D / G15D	0	125
Espanhola/Portuguesa	46 XY	ao nascimento	PS	sim			L108W	0,3	125
							P186L	0,2	
Japonesa	46 XY	3 meses	PS	sim			L205P / L205P	0	125
	46 XX	11 meses	PS	não					
Japonesa	46 XY		PS	sim			W308X / W308X	0**	132
Japonesa	46 XY	nr	PS	sim			R249X / R249X	0**	132
Japonesa	46 XY	nr	PS	sim			T259R / T259R	0	132
	46 XX	2 semanas	PS	não					
Mexico-hispânica	46 XY		PS	sim	não	sim	V248N	0**	132
							R249X	0**	
Paquistanesa	46 XY		PS	sim			273 deltaAA / 273	0**	132
Chilena	46 XX	20 dias	PS	não			E135X / E135X	0**	132
Paquistanesa	46 XX	10 dias	PS	sim	sim	sim	318 delA	0**	132
	46 XY		PS	sim	sim	sim	273 delAA	0**	
Egípcia	46 XY	6 meses	NPS	sim			A10V / A10V	29,1	125
	46 XY	4 meses	NPS	sim					
Francesa	46 XY	ao nascimento	NPS	sim			P155L	0	125
	46 XY	ao nascimento	NPS	sim			G294V	20,5	
Francesa	46 XY	ao nascimento	NPS	sim			L236S	100	125
							867delG	0**	
Turca	46 XY	4 anos	NPS	sim			A245P / A245P	35,4	126
Brasileira	46 XX	31 anos	NPS	não	não	sim	A82T / A82T	7,6	128
	46 XY	ao nascimento	NPS	sim	não				
	46 XY	ao nascimento	NPS	sim					
Brasileira	46 XX	5 anos	NPS	não	sim		A82T / A82T	7,6	128
Brasileira	46 XX	7 anos	NPS	não	sim		P222H	0	129
	46 XX	6,7 anos	NPS	não	sim		G129R	11,7	
Brasileira	46 XX	7,8 anos	NPS	não	sim		T259M / T259M	0	129
Americana	46 XX	18 anos	NPS	não	sim	sim	G129R	11,7	133
	46 XY	16 anos	NPS	sim	sim	sim	n6651	nr	
Americana	46 XX	puberdade	NPS	não	não	sim	Y254D / ?	0	134
Brasileira	46 XX	31 anos	NPS	sim			T259M / T259M	0	135
Paquistanesa	46 XY	ao nascimento	NPS	sim			L6F / L6F	6,5	137
Francesa	46 XY	20 meses	NPS	sim			N100S / N100S	2,8	125
nr	46 XY	ao nascimento	NPS	sim	sim		N100S	1,3	138
	46 XY	2 anos	NPS	não			266deltaA		
Escocesa	46 XY	5 anos	NPS	sim			L173R / L173R	52,8	125
	46 XX	2 anos	NPS	não					

nr: não relatado; PS/ NPS: perdedor de sal/ não perdedor de sal; GA: genitália ambígua; PP: pubarca precoce; PE: puberdade espontânea; A.E.*: atividade enzimática aparente em células intactas; **: atividade enzimática prevista; Ref.: referência.

AGRADECIMENTOS

Dra. Maricilda Pallandi de Mello agradece Marcela de Araújo, Luciana Campos Paulino, Ivy Freitas Lau, Osmar Vaz de Carvalho Netto, Fernanda Caroline Soardi (gene *CYP21*); Carlos Egydio de Carvalho e Junia Yara Penachioni (gene *CYP11B1*); aos Profs. Drs. Sofia Helena V. de Lemos-Marini e Gil Guerra Jr. pelo acompanhamento clínico dos pacientes; a Maria Madalena V. Rosa pelo auxílio técnico. À FAPESP, processos 92/03332-6, 97/07622-2, 97/14076-4, 98/16309-9, 00/07197-4, 01/08150-4, 01/06255-3, 01/13257-2, 02/04097-4, 02/04098-0.

Dra. Tânia Bachega agradece a Dra. Ana Elisa C. Billerbeck, Prof. Dr. Ivo J.P. Arnhold e Profa. Dra. Berenice B. de Mendonça. Às Dras. Guiomar Madureira, Enicy M.L. Brenha e Rosy Ueti pelo acompanhamento clínico dos pacientes. À FAPESP, processos 95/8325-6, 98/00243-9, 99/06468-5 e 99/12107-5 e ao CNPq, processos 501419/91-88 e 140.745/93-9.

Dra. Marivânia da Costa-Santos agradece ao Prof. Dr. Claudio Elias Kater e ao Dr. Richard Auchus.

Dra. Margaret de Castro agradece à Dra. Suemi Marui (gene *HSD3B2*), Natália Torres (gene *CYP21*); aos Profs. Drs. Ayrton C Moreira e Lucila Elias pelo acompanhamento clínico dos pacientes. À FAPESP, processos 00/00067-8 e 01/01148-4.

REFERÊNCIAS

1. New MI, Dupont B, Grumbach K, Levine LS. Congenital adrenal hyperplasia and related conditions. In Stambury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brown MS, editors. **The Metabolic Bases of Inherited Disease**. McGraw Hill, New York, 1982;973-1000.
2. Miller WL, Levine LS. Molecular and clinical advances in congenital adrenal hyperplasia. **J Pediatr** 1987;11:1-17.
3. Pang S, Wallace MA, Hofman L, et al. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **Pediatrics** 1988;81:866-74.
4. Thilén A, Larson A. Congenital adrenal hyperplasia Sweden 1969-1986. Prevalence, symptoms and age at diagnosis. **Acta Paediatr Scand** 1990;79:168-75.
5. Carrol MC, Campbell RD, Porter RR. Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. **Proc Natl Acad Sci USA** 1985;82:521-5.
6. Levine LS, Zachmann M, New MI, et al. Genetic mapping of the 21-hydroxylase-deficiency gene within the HLA linkage group. **N Engl J Med** 1978;299:911-5.
7. Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New MI. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. **Am J Hum Genet** 1985;37(4):650-67.
8. Werkmeister JW, New MI, Dupont B, White PC. Frequent deletion and duplication of the steroid 21-hydroxylase genes. **Am J Human Genet** 1986;39:461-9.
9. White PC, New MI, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. **Proc Natl Acad Sci USA** 1986;83:5111-5.
10. White PC, Gromberger D, et al. Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. **Proc Natl Acad Sci USA** 1985;82:1089-93.
11. Morel Y, Bristow J, Gitelman SE, Miller WL. Transcript encoded on the opposite strand of the human 21-hydroxylase/C4 locus. **Proc Natl Acad Sci USA** 1989a;86:6582-6.
12. Morel Y, André J, Lambert BU, et al. Rearrangements and point mutations of P450c21 genes are distinguished by five restriction endonuclease haplotypes identified by a new probing strategy in 57 families with congenital adrenal hyperplasia. **J Clin Invest** 1989b;83:527-36.
13. Tajima T, Fujieda K, Natuyama K, Fujii-Kuriyama Y. Molecular analysis of patients and carrier genes with congenital steroid 21-hydroxylase deficiency by using polymerase chain reaction and single-strand conformational polymorphism. **J Clin Invest** 1993;92:2182-90.
14. Tusié-Luna MT, Ramirez-Jimenez S, Ordóñez-Sánchez ML, et al. Low frequency of deletion alleles in patient steroid 21-hydroxylase. **Hum Genet** 1996;98:376-9.
15. Dardis A, Bergada I, Bergada C, Rivarola M, Belgorosky A. Mutations of the steroid 21-hydroxylase gene in an Argentinean population of 36 patients with classical congenital adrenal hyperplasia. **J Pediatr Endocrinol Metab** 1997;10:55-61.
16. Araujo M, Sanches MR, Suzuki LA, Guerra Jr G, Farah SB, De Mello MP. Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. **Braz Med Biol Res** 1996;29:1-13.
17. Bachega TASS, Billerbeck AEC, Madureira G, et al. Low frequency of CYP21B deletions in Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **Hum Hered** 1999;49:9-14.
18. Donohue PA, Van Dop C, McLean RH, White PC, Jospe N, Migeon CJ. Gene conversion in salt losing congenital adrenal hyperplasia with absent complement C4B protein. **J Clin Endocrinol Metab** 1986;62:995-1002.
19. Higashi Y, Hiromasa T, Tanae A. Effects of individual mutations in the P-450 (C21) pseudogene on the P-450 (C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. **J Biochem** 1991;109:638-44.
20. Speiser PW, Dupont J, Zhu D, et al. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Invest** 1992;90:584-95.
21. Wedell A, Thilén A, Ritzén EM, Stengler B, Luthman H. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. **J Clin Endocrinol Metab** 1994;78:1145-52.
22. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **Endocr Rev** 2001;21(3):245-91.
23. Miller WL. Gene conversions, deletions and polymorphisms in congenital adrenal hyperplasia. **Am J Hum Genet** 1988;42:4-7.

24. Morel Y, Murena M, Nicolino M, Forest MG. Molecular genetics of the congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. In JM Saéz; AC Brownie; A Capponi; EM Chambaz; F Mantero editors. **Cellular and Molecular Biology of the Adrenal Cortex**. Coloque INSERM/John Libbey Eurotext LTD **1992**;222:123-36.
25. Bachega TASS, Billerbeck AEC, Madureira G, et al. Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** **1998**;83:4416-9.
26. Paulino LC, De Araujo M, Guerra Jr G, Marini SNVL, De Melo MP. Mutation distribution and CYP21/C4 locus variability in Brazilian families with the classical form of the 21-hydroxylase deficiency. **Acta Paediatr** **1999**;88:275-83.
27. Billerbeck AEC, Bachega TASS, Frazzatto ET, et al. A novel missense mutation, GLY424SER, in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** **1999**;84:2870-2.
28. Lau IF, Soardi FC, Lemos-Marini SHV, Guerra Jr G, Baptista MTM, De Melo MP. H28+C insertion in the CYP21 gene: A novel frameshift mutation in a Brazilian patient with the classical form of 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** **2001**;86:5877-80.
29. Bachega TASS, Billerbeck AEC, Madureira G, et al. 21-hydroxylase in Brazil. **Braz J Med Biol Res** **2000**;52(5):601-7.
30. Bachega TASS, Billerbeck AEC, Marcondes JAM, Madureira G, Arnhold JJP, Mendonça BB. Influence of different genotypes on 17-hydroxyprogesterone levels in patients with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** **2000**;52:601-7.
31. Bachega TASS, Brenha EML, Billerbeck AEC, et al. Variable ACTH-stimulated 17-hydroxyprogesterone values in 21-hydroxylase deficiency carriers are not related to the different CYP21 gene mutations. **J Clin Endocrinol Metab** **2002**;87(2):786-90.
32. Tusié-Luna MT, Traktman P, White PC. Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. **J Biol Chem** **1990**;265:20916-22.
33. Wilson RC, Mercado AB, Cheng KC, New MI. Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. **J Clin Endocrinol Metab** **1995**;80:2322-9.
34. Tajima T, Okada T, Ma XM, Ramsey W, Bronstein S, Aguilera G. Restoration of adrenal steroidogenesis by adenovirus-mediated transfer of human cytochrome P450 21-hydroxylase into the adrenal gland of 21-hydroxylase-deficiency mice. **Gene Ther** **1999**;6(11):1898-903.
35. Jeffcoate TNA, Fleigner JRH, Russel SH, Davies JC, Wade AP. Diagnosis of the adrenal genital syndrome before birth. **Lancet** **1965**;2:553.
36. Pollack MS, Maurer D, Levine LS, New MI, et al. HLA typing of amniotic cells: The prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (21-OH-deficiency type). **Transplant Proc** **1979**;11:1726.
37. Hughes IA, Diaz J, Riad-Fahmy D, Laurence KM. Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia: reliability of amniotic fluid analysis. **J Med Genet** **1987**;24:344-7.
38. Speiser PW, White PC, Dupont J, Zhu D, Mercado AB, New MI. Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency by allele-specific-hybridization and Southern blot. **Hum Genet** **1994**;93:424-8.
39. Fitness J, Dixit N, Webster D, et al. Genotyping of CYP21, linked chromosome 6p markers, and a sex-specific gene in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. **J Clin Endocrinol Metab** **1999**;84:960-6.
40. Pang S, Pollack MS, Marshall RN, Immken L. Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency. **New Engl J Med** **1990**;322:111-5.
41. Bachega TASS, Madureira G, Brenha EML, et al. Tratamento da hiperplasia supra-renal congênita por deficiência da 21-hidroxilase. **Arq Bras Endocrinol Metab** **2001**;45/1:64-72.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. Kirita S, Morohashi K-I, Hashimoto T, Yoshioka H, Fujii-Kuriyama Y, Omura T. Expression of two kinds of cytochrome P-450(11beta) mRNA in bovine adrenal cortex. **J Biochem** **1988**;104:683-6.
47. Nonaka Y, Matsukawa N, Ying Z, Ogihara T, Okamoto M. Molecular Nature of Aldosterone Synthase, A Member of Cytochrome P-45011 β Family. **Endocr Res** **1991**;17:151-63.
48. Müller J, Schmid C, Boni-Schnetzler M, Lauber M. Two Forms of Cytochrome P45011 β in Rat Glomerulosa Cells - a Short Review. **Endocr Rev** **1991**;17:165-84.
49. Okamoto M, Nonaka Y, Ohta M, Takemori H, Krishna Halder S, Zhi-Nong W, et al. Cytochrome P450(11 β): Structure-Function Relationship of the Enzyme and its Involvement in Blood Pressure Regulation. **J Steroid Biochem Molec Biol** **1995**;53:89-94.
50. 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.
51. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Gutkin M, Fallo F, et al. Hereditary hypertension caused by chimaeric gene duplications and ectopic expression of aldosterone synthase. **Nature Genet** **1992**;2:66-74.
52. Curnow KM, Slutsker L, Vitek 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.
53. White PC, Curnow KM, Pascoe L. Disorders of Steroid 11beta-Hydroxylase Isozymes. **Endocr Rev** **1994**;15:421-38.
54. 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.
55. 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.

56. White PC, Dupont B, New MI, Leiberman E, Hochberg Z, Rösler A. A Mutation in CYP11B1 (Arg-448His) Associated with Steroid 11 β -Hydroxylase Deficiency in Jews of Moroccan Origin. **J Clin Invest** 1991;87:1664-7.
57. 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 β -Hydroxylase Deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1992;75:1278-81.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. Rosler A, Cohen H. Absence of steroid biosynthetic defects in heterozygote individuals for classic 11 beta-hydroxylase deficiency due to a R448H mutation in the CYP11B1 gene. **J Clin Endocrinol Metab** 1995;80:3771-3.
63. 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.
64. De Carvalho CE, Penachioni JY, Castro M, Moreira AC, De Mello MP. CYP11B1 Intragenic Polymorphisms Give Evidences For A Different Q356X Allele In An African-Brazilian Patient. **J Endocr Gen** 1999;1:79-86.
65. 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.
66. Merke DP, Tajima T, Chhabra A, Barnes K, Mancilla E, Baron J, et al. Novel CYP11B1 mutations in congenital adrenal hyperplasia due to steroid 11 beta-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83:270-3.
67. Cooper DN, Youssoufian H. The CpG dinucleotide and human disease. **Hum Genet** 1988;78:151-5.
68. 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 11beta-hydroxylase deficiency. **Endocr Res** 2000;26:797-801.
69. De Mello MP, Penachioni JY, Castro M, Bachega TASS, Mendonça BB. A Novel Mutation (G267S) on the CYP11B1 Gene in a Patient with 11beta-Hydroxylase Deficiency Causing Complete Virilization. **Pediatric Research** 2001;49:119A.
70. 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.
71. 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. 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 beta-hydroxylase deficiency. **Hum Mol Genet** 1997;6:1829-34.
73. Biglieri EG, Herron MA, Brust N. 17-Hydroxylation deficiency in man. **J Clin Invest** 1966;45:1946-53.
74. Grumbach MM, Conte FA. Disorders of sex differentiation. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, editors. Williams Textbook of Endocrinology. 9th Edition. Philadelphia: WB Saunders Company, 1998;1303-426.
75. Biglieri EG, Kater CE. Mineralocorticoids in congenital adrenal hyperplasia. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1991;40:493-9.
76. Yanase T, Simpson ER, Waterman MR. 17-alpha-Hydroxylase/17,20-lyase deficiency: From clinical investigation to molecular definition. **Endocr Rev** 1991;12:91-108.
77. Gupta MK, Geller DH, Auchus RJ. Pitfalls in Characterizing P450c17 Mutations Associated with Isolated 17,20-Lyase Deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86:4416-23.
78. Garcia-Mayor RVG, Sopena B, Fluiter E, Páramo C, Martin FR, Galofré JC, et al. Testicular adrenal-like tissue in a patient with 17 α -hydroxylase deficiency. **Horm Res** 1992;38:241-4.
79. Condom E, Villabona CM, Gómez JM, Carrera M. Adrenal myelolipoma in a woman with congenital 17-hydroxylase deficiency. **Arch Pathol Lab Med** 1985;109:1116-7.
80. Ogawa K, Hara A, Tanabe S, Tamori S, Voshida H, Pak CH, et al. A case of 17-alpha-hydroxylase deficiency syndrome associated with right adrenal tumor. **Clin Exp Hypertens A** 1984;6:863-77.
81. Gennes JL, Jambart S, Turpin G, Elkik F, Roger M. 17 α -Hydroxylase deficiency syndrome associated with bilateral streak gonads and impaired development of müllerian ducts derivatives. **Acta Endocrinol** 1982;100:68-76.
82. Matteson KJ, Picado-Leonard J, Chung BC, Mohandas TK, Miller WL. Assignment of the gene for adrenal P450c17 (steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase) to human chromosome 10. **J Clin Endocrinol Metab** 1986;63:789-91.
83. Biason A, Mantero F, Scaroni C, Simpson ER, Waterman MR. Deletion within the CYP17 Gene Together with Insertion of Foreign DNA is the Cause of Combined Complete 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase Deficiency in an Italian Patient. **Mol Endocrinol** 1991;5:2038-45.
84. Biason-Lauber A, Kempken B, Werder E, Forest MG, Einaudi S, Ranke MB, et al. 17-a-Hydroxylase/17,20-lyase deficiency as a model to study enzymatic activity regulation: Role of phosphorylation. **J Clin Endocrinol Metab** 2000;85:1226-31.
85. Yamaguchi H, Nakazato M, Miyazato M, Kangawa K, Matsukura S. A 5'-Splice site mutation in the cytochrome P450 steroid 17 α -hydroxylase gene in 17 α -hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82:1934-8.
86. Suzuki Y, Nagashima T, Nomura Y, Onigata K, Nagashima K, Morikawa A. A new compound heterozygous mutation (W17X, 436+5G \rightarrow A \rightarrow T) in the cytochrome P450c17 gene causes 17 α -hydroxylase/17,20-lyase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83:199-202.
87. Lin C, Martens J, Miller W. NF-1C, Sp1, and Sp3 Are Essential for Transcription of the Human Gene for P450c17 (Steroid 17 α -hydroxylase/17,20 lyase) in Human Adrenal NCI-H295A Cells. **Mol Endocrinol** 2001;15:1277-93.

88. Brentano ST, Picado-Leonard J, Mellon SH, Moore CCD, Miller WL. Tissue-specific, cAMP-induced, and phorbol ester repressed expression from the human P450c17 promoter in mouse cells. **Mol Endocrinol** 1990;4:1972-9.
89. Chung B-C, Picado-Leonard J, Haniu M, Bienkowski M, Hall PF, Shively JE. Cytochrome P450c17 (steroid 17 α -hydroxylase/17,20-lyase): cloning of human adrenal and testis cDNAs indicates the same gene is expressed in both tissues. **Proc Natl Acad Sci USA** 1987;84:407.
90. Geller DH, Auchus RJ, Miller WL. P450c17 mutations R347H and R358Q selectively disrupt 17,20-lyase activity by disrupting interactions with P450 oxidoreductase and cytochrome b5. **Mol Endocrinol** 1999;13:167-75.
91. Auchus RJ, Lee TC, Miller WL. Cytochrome b5 augments the 17,20 lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. **J Biol Chem** 1998;273:3158-65.
92. Swart P, Swart AC, Waterman MR, Estabrook RW, Mason JI. Progesterone 16 α -hydroxylase activity is catalyzed by human cytochrome P450 17 α -hydroxylase. **J Clin Endocrinol Metab** 1993;77:98-102.
93. Lee-Robichaud P, Wright JN, Aktar ME, Aktar M. Modulation of the activity of human 17 α -hydroxylase-17,20-lyase (CYP17) by cytochrome b5: endocrinological and mechanistic implications. **Biochem J** 1995;308:901-8.
94. Auchus R. The Genetics, Pathophysiology, and Management of Human Deficiencies of P450c17. **Endocrinol Metab Clin North Am** 2001;30:101-19.
95. Zuber MX, Simpson ER, Waterman MR. Expression of Bovine 17 α -hydroxylase cytochrome P450 cDNA in nonsteroidogenic (COS 1) cells. **Science** 1986;234:1258-61.
96. Lin D, Black SM, Nagahama Y, Miller WL. Steroid 17 α -hydroxylase and 17,20 lyase activities of P450c17: contributions of serine106 and P450 reductase. **Endocrinology** 1993;132:2498-506.
97. Santos MC, Kater CE, Grupo Multicêntrico Brasileiro de Estudo de Hiperplasia Adrenal Congênita. Estudo de Frequência da Hiperplasia Adrenal Congênita em Centros de Referência Médica do Brasil. **Arq Bras Endocrinol Metab** 1998;42:385-92.
98. Costa-Santos M, Kater CE, Auchus RJ. Molecular-Genetic Study of 20 Brazilian Families Affected By 17-OH-Deficiency. In: Program & Abstracts. The Endocrine Society's 83rd Annual Meeting. **Denver, 2001**:108.
99. Fardella CE, Hum DW, Homoki J, Miller W. Point Mutation of Arg 440 to His Cytochrome P450c17 Causes Severe 17 α -Hydroxylase Deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1994;79:160-4.
100. Yanase T. 17 α -Hydroxylase / 17,20-lyase defects. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1995;53:153-7.
101. Geller DH, Auchus RJ, Mendonça BB, Miller WL. The genetic and functional basis of isolated 17,20 lyase deficiency. **Nature Genet** 1997;17:201-5.
102. Kagimoto M, Winter JSD, Kagimoto K, Simpson ER, Waterman MR. Structural characterization of normal and mutant human steroid 17 α -Hydroxylase genes: molecular basis of one example of combined 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase deficiency. **Mol Endocrinol** 1988;2:564-70.
103. Yanase T, Kagimoto M, Matsui N, Simpson ER, Waterman MR. Combined 17 α -Hydroxylase /17,20-Lyase Deficiency due to a stop codon in the N-Terminal region of 17 α -Hydroxylase cytochrome P-450. **Mol Cel Endocrinol** 1988;59:249-53.
104. Yanase T, Kagimoto M, Suzuki S, Hashiba K, Simpson ER, Waterman MR. Deletion of a Phenylalanine in the N-Terminal Region of Human Cytochrome P-450 17 α Results in Partial Combined 17 α -Hydroxylase /17,20-Lyase Deficiency. **J Biol Chem** 1989;264:18076-82.
105. Yanase T, Sanders D, Shibata A, Matsui N, Simpson ER, Waterman MR. Combined 17 α -Hydroxylase /17,20-Lyase Deficiency due to a 7-Basepair Duplication in the N-Terminal Region of the Cytochrome P450 17 α (CYP17) Gene. **J Clin Endocrinol Metab** 1990;70:1325-9.
106. Lin D, Harikrishna JA, Moore CCD, Jones KL, Miller WL. Missense Mutation Serine 106 \rightarrow Proline Causes 17 α -Hydroxylase Deficiency. **J Biol Chem** 1991;266:15992-38.
107. Fardella CE, Zhang L-H, Mahachoklertwattana P, Lin Dog, Miller W. Deletion of Amino Acids Asp487-Ser488-Phe489 in Human Cytochrome P450c17 Causes Severe 17 α -Hydroxylase Deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1993;77:489-93.
108. Toyata N, Monno S, Kobayashi M. Two-bp deletion in exon 5 of CYP 17 gene in a family with 17 α -hydroxylase deficiency. **Folia Endocr Japon** 1993;69:295(abstract).
109. Imai Tsuneo, Gliberman H, Gertner JM, Kagawa N, Waterman MR. Expression and Purification of Functional Human 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase (P450c17) in Escherichia coli. **J Biol Chem** 1993;268:19681-9.
110. Rumsby G, Skinner C, Lee HA, Honour JW. Combined 17 α -Hydroxylase/17,20-lyase deficiency caused by heterozygous stop codons in the cytochrome P450 17 α -hydroxylase gene. **Clin Endocrinol** 1993;39:483-5.
111. Monno S, Ogawa H, Date T, Fujioka M, Miller W, Kobayashi M. Mutation of Histidine 373 to Leucine in Cytochrome P40c17 Causes 17 α -Hydroxylase Deficiency. **J Biol Chem** 1993;268:25811-7.
112. Oshiro C, Takasu N, Wakugami T, Komiya I, Yamada T, Eguchi Y, et al. Seventeen α -hydroxylase deficiency with one base pair deletion of the cytochrome P45c17 (CYP17) gene. **J Clin Endocrinol Metab** 1995;80:2526-9.
113. Laflamme N, Leblanc J-F, Mailloux J, Faure N, Lalinie F, Simard J. Mutation R96W in cytochrome P450c17 gene causes combined 17 α -hydroxylase/17,20-lyase deficiency in two French Canadian patients. **J Clin Endocrinol Metab** 1996;81:264-8.
114. Biason-Lauber A, Leiberman E, Zachmann M. A single amino acid substitution in the putative redox partner-binding site of P45c17 as cause of isolated 17,20-lyase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82:3807-12.
115. Yamaguchi H, Nakazato M, Miyazato M, Toshimori H, Oki S, Shimizu K, et al. Identification of a novel splicing mutation and 1-bp deletion in the 17 α -hydroxylase gene of Japanese patients with 17 α -hydroxylase deficiency. **Hum Genet** 1998;102:635-9.
116. Satoh J, Kuroda Y, Nawata H, Yanase T. Molecular basis of hypokalemic myopathy caused by 17-hydroxylase/17,20-lyase deficiency. **Neurology** 1998;51:1748-51.
117. Ching-Wan Lam, Wiebke Arlt, Chi-Kwok Chan, John W. Honour, Chin Jia Lin, Sui-Fan Tong, et al. Mutation of Proline 409 to Arginine in the Meander Region of Cytochrome P450c17 Causes Severe 17 α -Hydroxylase Deficiency. **Mol Gen Met** 2001;72:254-9.
118. Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Furukawa K, Koshida H, Miyamori I, et al. Genetic analysis of the cytochrome P-450c17 α (CYP17) and aldosterone synthase (CYP11B2) in Japanese patients with 17 α -Hydroxylase deficiency. **Clin Endocrinol** 2001;54:751-8.

119. Katsumata N, Satoh M, Mikami A, Mikami S, Nagashima-Miyokawa A, Sato N, et al. New Compound Heterozygous Mutation in the CYP17 Gene in a 46,XY Girl with 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase Deficiency. **Horm Res** 2001;55:141-6.
120. Di Cerbo A, Bignon-Laubert A, Savino M, Piemontese MR, Di Giorgio A, Perona M, et al. Combined 17 α -Hydroxylase/17,20-lyase deficiency caused by Phe93Cys mutation in the CYP17 gene. **J Clin Endocrinol Metab** 2002;87:898-905.
121. Bongiovanni AM. The adrenogenital syndrome with deficiency of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. **J Clin Invest** 1962;41:2086-92.
122. Luu The V, Lachance Y, Labrie C, Leblanc G, Thomas J, Strickler R, et al. Full-length cDNA structure and deduced amino acid sequence of human 3 β -hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase. **Mol Endocrinol** 1989;3:1310.
123. Simard J, Durocher F, Mebarki F, Turgeon C, Sanchez R, Labrie Y, et al. Molecular biology and genetics of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/D5 D4 -isomerase gene family. **J Endocrinol** 1996;150:S189-207.
124. Rhéaume E, Simard J, Morel Y, Mebarki F, Zachmann M, Forest MG, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to point mutations in the type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene. **Nat Genet** 1992;1:239-45.
125. Moisan AM, Ricketts ML, Tardy V, Desrochers M, Mébarki F, Chaussain JL, et al. New insight into the molecular basis of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency: identification of eight mutations in the HSD3B2 gene in eleven patients from seven new families and comparison of the functional properties of twenty-five mutant enzymes. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84:4410-25.
126. Simard J, Rhéaume E, Sanchez R, Laflamme N, Launoit Y, Luu-The V, et al. Molecular basis of congenital adrenal hyperplasia due to 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. **Mol Endocrinol** 1993;7:716-28.
127. Rosenfield RL, Rich BH, Wolfsdorf, Cassorla F, Parks JS, Bongiovanni AM, et al. Pubertal presentation of congenital D5-3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. **J Clin Endocrinol Metab** 1980;51:345-53.
128. Mendonça BB, Russel AJ, Vasconcelos-Leite M, Arnhold IJ, Bloise W, Wajchenberg BL, et al. Mutation in 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II associated with pseudohermaphroditism in males and premature pubarche or cryptic expression in females. **J Mol Endocrinol** 1994;12:119-22.
129. Marui S, Castro M, Latronico AC, Elias LL, Arnhold IJ, Moreira AC, et al. Mutations in the type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD3B2) gene can cause premature pubarche in girls. **Clin Endocrinol** 2000;52(1):67-75.
130. Simard J, Ricketts ML, Moisan AM, Tardy V, Peter M, Vliet GV, et al. A new insight into the molecular basis of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. **Endocr Res** 2000;26(4):761-70.
131. Pang S, Lerner AJ, Stoner E, Oberfield SE, Engel I, New MI. Late-onset adrenal steroid 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency I: A cause of hirsutism in pubertal and post-pubertal women. **J Clin Endocrinol Metab** 1985;60:428-39.
132. Pang S. Congenital adrenal hyperplasia owing to 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. **Endocrinol Metab Clin North Am** 2001;30(1):81-99.
133. Rhéaume E, Sanchez R, Simard J, Chang YT, Wang J, Pang S, et al. Molecular basis of congenital adrenal hyperplasia in two siblings with classical nonsalt 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1994;79:1012.
134. Sanchez R, Rheume E, Laflamme N, Rosenfield RL, Labrie F, Simard J. Detection and functional characterization of the novel missense mutation Y254D in the type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β HSD) gene of a female patient with nonsalt-losing 3 β -HSD deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1994;78:561.
135. Paula FJA, Dick-De-Paula I, Pontes A, Schimitt FCL, Mendonça BB, Foss MC. Hyperandrogenism due to 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency with accessory adrenocortical tissue: a hormonal and metabolic evaluation. **Braz J Med Biol Res** 1994;27:1149-58.
136. Alos N, Moisan AM, Ward L, Desrochers M, Legault L, Leboeuf G, et al. A novel A10E homozygous mutation in the HSD3B2 gene causing severe salt-wasting 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency in 46,XX and 46,XY French-Canadians: Evaluation of gonadal function after puberty. **J Clin Endocrinol Metab** 2000;85(5):1968-74.
137. Zhang L, Mason JI, Naiki Y, Copeland KC, Magana MC, Gordon-Walker TT, et al. Characterization of two novel homozygous missense mutations involving codon 6 and 259 of type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β HSD) gene causing, respectively, nonsalt-wasting and salt-wasting 3 β HSD deficiency disorder. **J Clin Endocrinol Metab** 2000;85(4):1678-85.
138. Cartin MS, Russell AJ, Fisher RA, Wallace AM, Arnhold IJP, Mason JI, et al. Phenotypic variability and origins of mutations in the gene encoding 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II. **J Mol Endocrinol** 2000;24:75-82.

Endereço para correspondência:

Margaret de Castro
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP
14049-900 Ribeirão Preto, SP
Fax: (016) 633-1144
e.mail: castrom@fmrp.usp.br