

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Cristina Botelho Barra

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AO GLICOCORTICOIDE
EM PACIENTES COM HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA**

Belo Horizonte

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitora: Prof^ª. Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor: Prof. Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Fábio Alves da Silva Junior

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Mário Fernando Montenegro Campos

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Humberto José Alves

Vice-Diretora da Faculdade de Medicina: Prof^ª. Alamanda Kfoury Pereira

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof^ª. Eli Iola Gurgel Andrade

Chefe do Departamento de Pediatria: Prof^ª. Mônica Maria de Almeida Vasconcelos

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente:

Coordenadora: Prof^ª. Roberta Maia de Castro Romanelli

Subcoordenadora: Prof^ª. Débora Marques Miranda

Cristina Botelho Barra

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AO GLICOCORTICOIDE
EM PACIENTES COM HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Ivani Novato Silva

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Belo Horizonte

2020

Barra, Cristina Botelho.

B268a Avaliação da sensibilidade ao Glicocorticoide em pacientes com Hiperplasia Adrenal Congênita [manuscrito]. / Cristina Botelho Barra. - - Belo Horizonte: 2020.

107f.: il.

Orientador (a): Ivani Novato Silva.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Glucocorticoides. 2. Hiperplasia Suprarrenal Congênita. 3. Receptores de Glucocorticoides. 4. Dissertação Acadêmica. I. Silva, Ivani Novato. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WK 755

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

FOLHA DE APROVAÇÃO

CRISTINA BOTELHO BARRA

Tese de Doutorado designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE, SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau de **DOCTORA**, defendida e aprovada, no dia doze de agosto de 2020, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes Professores Doutores: Ivani Novato Silva, orientadora - UFMG, Tânia Aparecida Sartori Sanchez Bachega - USP, Claudio Elias Kater - UNIFESP, Jorge Andrade Pinto - UFMG e Marcelo Rizzatti Luizson - UFMG.

Belo Horizonte, 12 de agosto de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Tânia Aparecida Sartori Sanchez Bachega, Usuário Externo**, em 12/08/2020, às 18:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudio Elias Kater, Usuário Externo**, em 13/08/2020, às 10:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ivani Novato Silva, Presidente da comissão**, em 13/08/2020, às 15:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Rizzatti Luizson, Professor do Magistério Superior**, em 13/08/2020, às 17:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jorge Andrade Pinto, Coordenador**, em 14/08/2020, às 09:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0211005** e o código CRC **F66FF8CD**.

*À Elis,
fonte de toda a minha força e inspiração.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Ivani Novato Silva, minha orientadora, por me incentivar e acompanhar toda a minha trajetória acadêmica, pela enorme sabedoria, paciência, compreensão, confiança e amizade.

À Prof^a. Ana Cristina Simões e Silva, pela disponibilização dos recursos e estrutura para a realização do trabalho de bancada, e ao André Rolim Belisário, pela inestimável ajuda com a genotipagem.

Às colegas Thais Villela e Nedstâni Soares, também autoras deste trabalho, pela parceria.

Ao Prof. Enrico Colosimo e seus alunos (Ruy, Ana Clara e Felipe), pela disponibilidade e auxílio com a análise estatística.

À Vivien Gonzaga pela revisão da tese.

Aos colegas da UFMG: da Pediatria (Prof^{as}. Márcia Penido, Paula Valladares, Cláudia Ribeiro, Janaina Moreira); Saúde do Adolescente (Prof^a. Cristiane Grillo, Patrícia Regina Guimarães); Endocrinologia Pediátrica (Prof^a. Isabela Pezzuti, Rafael Mantovani, Sarah Baccarini); do Núcleo de Investigação em Anorexia e Bulimia (Prof. Henrique Torres, Prof^a. Ana Maria, Prof^a. Bernadete, Mônica Lima, Maria de Lourdes, Tâmara Oliveira, Vivian Ferreira e Patricia Spyer); e do NUPAD, pelo apoio e pelos momentos agradáveis de convívio. Especialmente, à Prof^a. Rachel Fernandes, pela delicadeza e compreensão. Ao Prof. Roberto Assis e à minha tutora no ingresso à UFMG, Prof^a. Cristina Alvim, pelo grande incentivo profissional. Aos meus alunos, por tornarem as minhas manhãs de trabalho tão prazerosas.

Aos participantes deste estudo e seus familiares, pela confiança.

À Cristiane Barreto, por me guiar no meu processo analítico.

Aos meus pais, pelo incentivo e suporte financeiro. Ao meu querido irmão Hugo, pelo apoio e grande ajuda com a edição das figuras e à Laura pelas traduções. Ao Pedro e à sua família, em especial a seus pais, Maninha e William, pelo afeto e dedicação à Elis, na minha ausência.

RESUMO

A reposição crônica substitutiva do glicocorticoide (GC) é a base do tratamento da Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC) causada pela deficiência da 21-hidroxilase (D-21OH), na sua forma clássica. Há uma grande variabilidade na resposta ao GC e parte dessa variação poderia ser explicada pela presença de polimorfismos do gene do receptor GC (do inglês, *glucocorticoid receptor*, GR). Os polimorfismos do gene do GR mais estudados (*Tth111I*, *ER22*, *23EK*, *N363S*, *BcII* e *9β*) são herdados em haplótipos e poderiam levar ao espectro de resposta ao GC. Foi realizado um estudo da frequência desses polimorfismos do GR (rs10052957, rs6189, rs6190, rs56149945, rs41423247, rs6198) com uma abordagem do tipo caso-controle e posterior associação genótipo-fenótipo. A população de interesse foi composta por 102 indivíduos com a forma clássica da D-21OH, recrutados em 2016, nos ambulatórios de endocrinologia do Hospital das Clínicas (HC-UFGM); e 163 controles saudáveis. Foi observado um grande desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos. *Tth111I* em heterozigose foi mais comum dentre os casos ($p=0,004$), enquanto *BcII* em heterozigose foi mais comum dentre os controles ($p=0,078$). Não houve diferenças estatísticas nas frequências gerais dos haplótipos, exceto o haplótipo 4 (*BcII*), que foi menos comum dentre os casos ($p=0,01795$). Seis haplótipos principais foram descritos: Selvagem (55,3%); *Tth111I* + *BcII* (13,2%); *Tth111I* + *9β* (12,3%); *BcII* (11,3%); *Tth111I* (3,4%); *Tth111I* + *ER22/23EK* + *9β* (2,5%). Dentre esses, destaca-se que quatro continham a variante *Tth111I*. Uma subamostra dos casos foi submetida ao teste de supressão com dexametasona em doses muito baixas: 9 crianças, 9 adolescentes, 10 adultos, com idade mediana de 12 (2-34) anos; 21 (75%) do sexo feminino, 7 (25%) do sexo masculino; 21 (75%) perdedores de sal (PS) e 7 (25%) virilizantes simples (VS). Os indivíduos portadores das variantes *Tth111I* e *9β*, associadas ou não às variantes *ER22/23EK*, apresentaram menor supressão do cortisol, em comparação aos portadores de *BcII* ($p=0,098$). PS tiveram menor supressão do cortisol em relação aos VS ($p<0,001$). VS com genótipos de hipersensibilidade ao GC apresentaram maior queda dos níveis médios de cortisol em comparação com aqueles com genótipos de resistência ao GC ($p=0,0023$). Crianças menores de 10 anos apresentaram maior supressão do cortisol em comparação com adolescentes e adultos ($p=0,035$). O perfil farmacogenômico poderia auxiliar a prever a resposta ao GC e contribuir para a discussão de uma terapia mais individualizada, resultando em melhores resultados clínicos a longo prazo.

Palavras-chave: Glucocorticoides. Receptores de glucocorticoides. Hiperplasia Suprarrenal Congênita.

ABSTRACT

Substitutive glucocorticoid (GC) long-term replacement serves as mainstay treatment of Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency (D-21OH) in its classical form. There is great variability in the GC response and part of this variation could be explained by glucocorticoid receptor (GR) gene polymorphisms. The most studied GR gene polymorphisms (*Tth1111*, *ER22*, *23EK*, *N363S*, *BcII* and *9β*) are inherited in haplotypes and could lead to a GC response spectrum. Thereby, we studied the frequency of the GR polymorphisms (rs10052957, rs6189, rs6190, rs56149945, rs41423247, rs6198), with a case-control approach and subsequently explored genotype-phenotype correlations. The population of interest was composed of 102 subjects with 21OHD-classical form, recruited in 2016, at Hospital das Clínicas (HC-UFG) endocrinology care centre; and 163 healthy controls. Strong linkage disequilibrium was seen between all polymorphisms. Heterozygous-*Tth1111* occurred more commonly amongst cases ($p=0.004$), while heterozygous-*BcII* was more common amongst controls ($p=0.078$). There were no statistical differences in overall haplotype frequencies, except for haplotype 4 (*BcII*), which occurred less commonly amongst cases ($p=0.01795$). Six main haplotypes were determined: Wild (55.3%); *Tth1111* + *BcII* (13.2%); *Tth1111* + *9β* (12.3%); *BcII* (11.3%); *Tth1111* (3.4%); *Tth1111* + *ER22/23EK* + *9β* (2.5%); it should be noted that four of them presented the *Tth1111*-variant. A subsample of cases was submitted to the very-low dose dexamethasone suppression test: 9 children, 9 adolescents, 10 adults, with a median age of 12 (2-34) years; 21 (75%) females, 7 (25%) males; 21 (75%) with the salt-wasting form (SW) and 7 (25%) with the simple virilizing form (SV). Carriers of the *Tth1111* and *9β*-variants, whether or not associated with the *ER22/23EK*- variants, showed less cortisol suppression, compared to *BcII*-carriers ($p=0.098$). Salt-wasting subjects had less cortisol suppression, compared to simple-virilizing ($p<0.001$). SV subjects with GC hypersensitivity-genotypes showed decreased average cortisol levels compared to those with GC resistance-genotypes ($p=0.0023$). Children younger than 10 years presented more cortisol suppression compared to adolescents and adults ($p=0.035$). The pharmacogenomic profile might help to predict the GC response and contribute to the discussion of a more individualized therapy, resulting in better long-term clinical outcomes.

Keywords: Glucocorticoids. Receptors, Glucocorticoid. Adrenal Hyperplasia, Congenital.

LISTA DE SIGLAS

11 β -HSD	11 β -hidroxiesteroide desidrogenase
17OHP	17-hidroxiprogesterona
ACO	Anticoncepcional oral
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
BPS	Pares de bases
CBG	<i>Corticosteroid-binding globulin</i> , do inglês
CpG	<i>Cytosine connected by a phosphodiester bond to guanine</i> , do inglês
CRH	<i>Corticotropin-releasing hormone</i> , do inglês
D-21OH	Deficiência da enzima 21 α -hidroxilase
DL	Desequilíbrio de ligação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GR	Receptor glicocorticoide
HAC	Hiperplasia Adrenal Congênita
HH	Hipotalâmico-hipofisário
HHA	Hipotalâmico-hipofisário-adrenal
HWE	<i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i> , do inglês
IIQ	Intervalo interquartil
LD	<i>Linkage disequilibrium</i> , do inglês
MAF	<i>Minor allelic frequency</i> , do inglês
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade humano
MR	Receptor mineralocorticoide
NUPAD	Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , do inglês
PPC	Puberdade precoce central
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> , do inglês
RNA _m	RNA mensageiro
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i> , do inglês
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esteroidogênese; em destaque, o bloqueio enzimático na deficiência da enzima 21-hidroxilase	16
Figura 2 – Localização do gene <i>CYP21A2</i> no sistema antígeno leucocitário HLA	17
Figura 3 – Correlação entre o genótipo e o grau da deficiência enzimática na deficiência da 21-hidroxilase (fenótipo)	18
Figura 4 – Fluxograma para o diagnóstico da forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase (D-21OH) após teste de estímulo com o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) sintético; 17-hidroxiprogesterona (17OHP)	20
Figura 5 – Ritmo circadiano do cortisol (em nmol/L), de um indivíduo adulto	23
Figura 6 – Média das concentrações plasmáticas de hidrocortisona (ng/mL) em adultos saudáveis (n=15) durante doze horas, após uso de 20 mg em suspensão (círculo vazado) ou quatro formulações em cápsulas de hidrocortisona bioequivalentes	24
Figura 7 – Estrutura 3D de um receptor nuclear, mostrando os seus três domínios principais	27
Figura 8 – Região promotora do gene <i>NR3C1</i> do receptor glicocorticoide	28
Figura 9 – Estrutura do gene <i>NR3C1</i> no sentido 5-3', onde estão sinalizadas ilhas de sequências de citosina-guanina (ilhas de CpG) sujeitas a alterações epigenéticas	28
Figura 10 – Estrutura do gene <i>NR3C1</i> com seus exons variantes, levando ao <i>splicing</i> alternativo do GR e às isoformas α e β	29
Figura 11 – Isoformas do GR por <i>splicing</i> alternativo: GR α , GR β , GR γ , GR-A, GR-P	30
Figura 12 – Subisoformas GR- α geradas por iniciação de tradução alternativa e sítios de modificação pós-tradução	31
Figura 13 – Mutações já identificadas do gene do receptor glicocorticoide, <i>NR3C1</i>	32
Figura 14 – Localização de polimorfismos do gene <i>NR3C1</i>	34
Figura 15 – Localização dos polimorfismos <i>BclI</i> do gene <i>NR3C1</i> , próximos ao exon 2	36
Figura 16 – Desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos do gene <i>NR3C1</i>	37
Figura 17 – Fluxograma do estudo	53
Figura 18 – Genotipagem do polimorfismo <i>BclI</i>	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Justificativa	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	Hiperplasia Adrenal Congênita pela Deficiência da 21-Hidroxilase	15
2.2	Receptor Glicocorticoide	26
2.3	Polimorfismos do Gene <i>NR3C1</i> e a Resistência ao Glicocorticoide	32
2.4	Avaliação Funcional da Sensibilidade ao Glicocorticoide	37
3	OBJETIVOS	52
3.1	Objetivo Geral	52
3.2	Objetivos Específicos	52
4	MÉTODOS	53
4.1	Ética	53
4.2	Fluxograma do Estudo	53
4.3	Estudo da Frequência dos Polimorfismos e Haplótipos	54
4.4	Avaliação Funcional da Sensibilidade ao Glicocorticoide	57
4.5	Financiamento	60
5	ARTIGOS	62
	GLUCOCORTICOID RECEPTOR GENE POLYMORPHISMS AND HAPLOTYPES IN CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA	62
	PHARMACOGENOMIC MARKERS OF GLUCOCORTICOID RESPONSE IN CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA	81
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
7	ANEXOS	103

1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho consiste em uma tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração da Saúde da Criança e do Adolescente, da Faculdade de Medicina da UFMG.

As primeiras sessões da tese (revisão da literatura, objetivos e métodos) e as considerações finais são apresentadas em língua portuguesa, em formato convencionalmente recomendado para trabalhos monográficos, ao passo que os resultados do trabalho e a discussão foram apresentados em dois artigos redigidos na língua inglesa.

A normatização da tese acompanha o estilo Vancouver, desenvolvido pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (CIERM), fundamentado no padrão American National Standards Institute (ANSI), e adaptado pelo National Library of Medicine (NLM), Estados Unidos, apresentados no *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication*.^{*} Essas normas contemplam particularmente a organização e apresentação do referencial teórico consultado, sendo os demais elementos textuais e pós-textuais da revisão da literatura formatados segundo modelo da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)^{**} e orientações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para a redação de teses (Resolução 03/2010, de 05 de fevereiro de 2010).^{***}

1.1 Justificativa

A Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC) constitui um grupo de doenças caracterizadas por uma insuficiência enzimática na biossíntese do cortisol. A deficiência da 21-hidroxilase (D-21OH) é sua causa mais comum, com incidência global de 1.15.000 nascimentos na sua forma clássica. Assim, a D-21OH é amplamente estudada no campo da Endocrinologia Pediátrica. Além de ser caracterizada pela deficiência enzimática na biossíntese do cortisol, a D-21OH está relacionada a outras alterações do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA) que levam à secreção pré-natal excessiva de andrógenos. Eventos potencialmente fatais por desequilíbrios hidroeletrólíticos podem ocorrer no primeiro mês de vida entre recém-nascidos acometidos com a forma clássica perdedora de sal.¹⁻³ Após 2013, a pesquisa da forma clássica da D-21OH foi

* Disponível em: <www.icmje.org>. Acesso em: 04 mar. 2020.

** Versão 2020, disponível em: <<https://www.normasabnt.org/>>. Acesso em: 04 mar. 2020.

*** Disponível em:

<http://ftp.medicina.ufmg.br/cpg/programas/saude_crianca/Arquivos%202013/resolucao_03_2010_regulamenta_formato_de_teses_e_dissertacoes.pdf>. Acesso em: 04 mar. 2020.

inserida no Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais (Teste do Pezinho), com a participação das pesquisadoras envolvidas neste trabalho.^{4,5}

A dificuldade de tratamento dos pacientes com D-21OH é fortemente reconhecida, sendo a base da terapêutica da forma mais grave da D-21OH a reposição crônica substitutiva do glicocorticoide. Alcançar a dose adequada do glicocorticoide durante a infância e adolescência é um grande desafio, no intuito de se evitar tanto o hiperandrogenismo quanto o hipercortisolismo. Por outro lado, a dose de glicocorticoide necessária para o tratamento é bastante variável entre os pacientes, o que sugere uma variabilidade interindividual para a sensibilidade ao glicocorticoide, provavelmente geneticamente determinada.⁶⁻¹⁰ O estudo dos polimorfismos genéticos da resposta ao glicocorticoide, relacionados ao gene do receptor para o glicocorticoide, *NR3C1*, pode esclarecer, pelo menos em parte, essa questão e auxiliar na individualização do tratamento e manejo dos pacientes com D-21OH.

REFERÊNCIAS

1. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev.* 2011;32(1):81-151.
2. Turcu AF, Auchus RJ. Adrenal steroidogenesis and congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2015;44(2):275-96.
3. Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, Baskin IS, Conway GS, Merke DP, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: An Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(11):4043-88.
4. Barra CB, Silva IN, Pezzuti IL, Januário JN. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Rev Assoc Med Bras.* 1992;58(4):459-64.
5. Pezzuti IL, Barra CB, Mantovani RM, Januário RM, Silva IN. A Three-year follow-up of congenital adrenal hyperplasia newborn screening. *J Pediatr (Rio J).* 2014;90(3):300-7.
6. Cordeiro GV, Silva IN, Goulart EM, Chagas AJ, Kater CE. Final height in congenital adrenal hyperplasia: the dilemma of hypercortisolism versus hyperandrogenism. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2013;57(2):126-31.
7. Chapman K, Holmes M, Seckl J. 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase: intracelular gatekeepers of tissue glucocorticoid action. *Physiol Rev;*93(3):1139-206.
8. Barnes PJ, Adcock IM, Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet.*2009;373(9678):1905:17.
9. Saka N, Güven M, Bas F, Darendeliler F, Bundak R, Günöz H, et al. Glucocorticoid receptors in patients with congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Endocrinol Metab.*2000;13(8):1101-7.
10. Huizenga NA, Koper JW, de Lange P, Pols HA, Stolk RP, Grobbee DE, et al. Interperson variability but intraperson stability of baseline plasma cortisol concentrations, and its relation to feedback sensitivity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to a low dose of dexamethasone in elderly individuals. *J Clin Endocrinol Metab.*1998;83(1):47-54.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Hiperplasia Adrenal Congênita pela Deficiência da 21-Hidroxilase

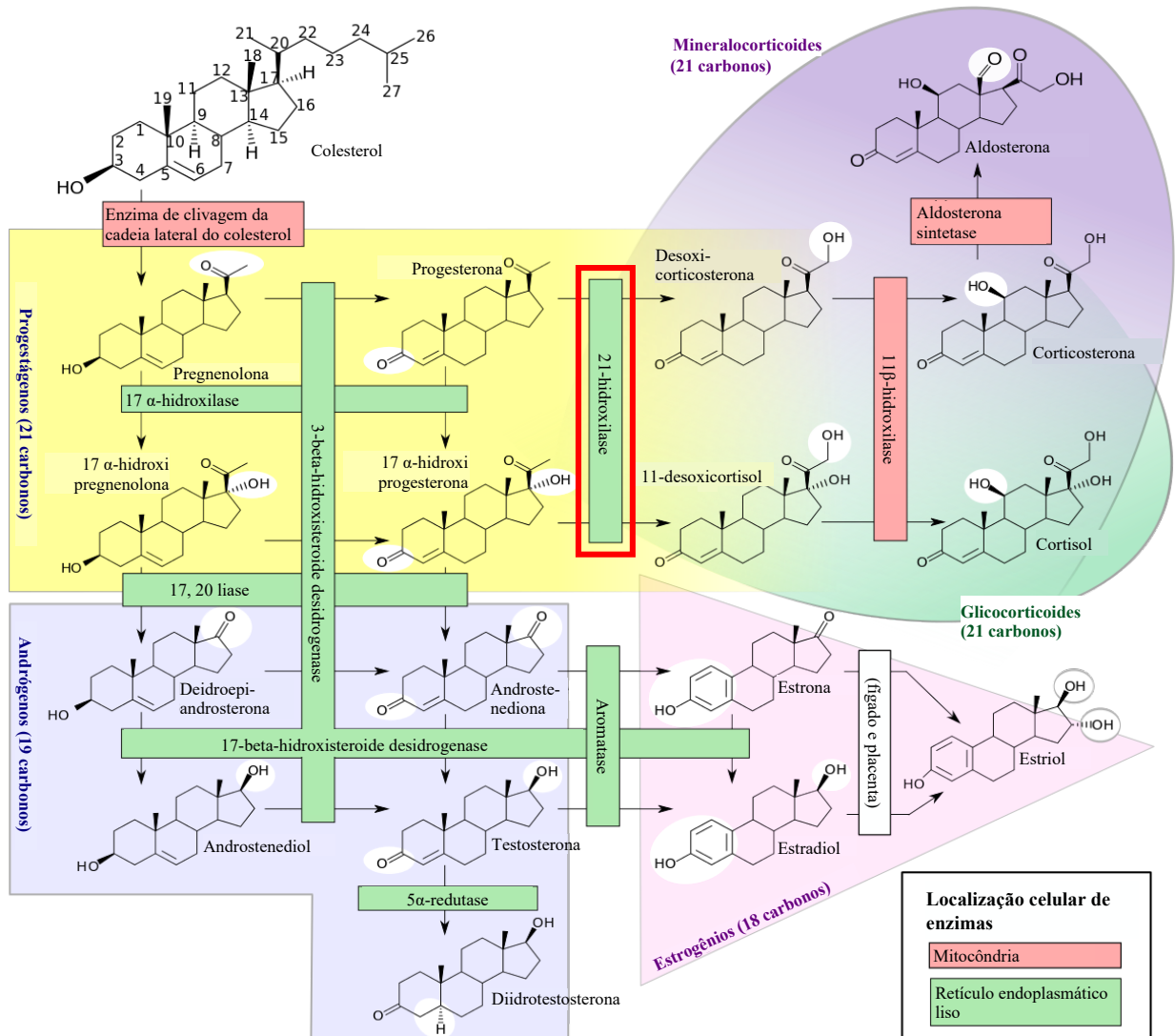
A Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC) constitui um grupo de doenças caracterizadas por uma deficiência enzimática na biossíntese do cortisol. Essa alteração leva ao estímulo do eixo hipotalâmico-hipofisário (HH), com elevação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) por uma alça de retroalimentação (*feedback*).

Além da deficiência do cortisol, os diferentes tipos de hiperplasia adrenal podem ter associados um aumento, em virtude do excesso de ACTH, ou uma diminuição, em razão da deficiência enzimática, da produção de esteroides sexuais e mineralocorticoides.¹

Embora cada complexo enzimático envolvido na síntese do cortisol no córtex adrenal possa sofrer algum comprometimento e levar à hiperplasia glandular pelo acúmulo de precursores esteroides, em mais de 90% dos casos², a hiperplasia adrenal é causada pela deficiência da 21-hidroxilase (D-21OH), em destaque na **Figura 1**³.

Essa enzima 21-hidroxilase consiste em 495 aminoácidos, com peso molecular de 52 kDa⁴. É caracterizada por ser substrato-específica e ter alta eficiência catalítica. É responsável pela conversão da progesterona e 17-hidroxiprogesterona (17OHP) a 11-desoxicorticosterona e 11-desoxicortisol, respectivamente, por meio da hidroxilação na posição C21 (**Figura 1**). O que ocorre na sua deficiência é um acúmulo dos precursores que são substratos para a 21-hidroxilação, e esses são desviados para a via da síntese de andrógenos⁵.

Figura 1 – Esteroidogênese; em destaque, o bloqueio enzimático na deficiência da enzima 21-hidroxilase



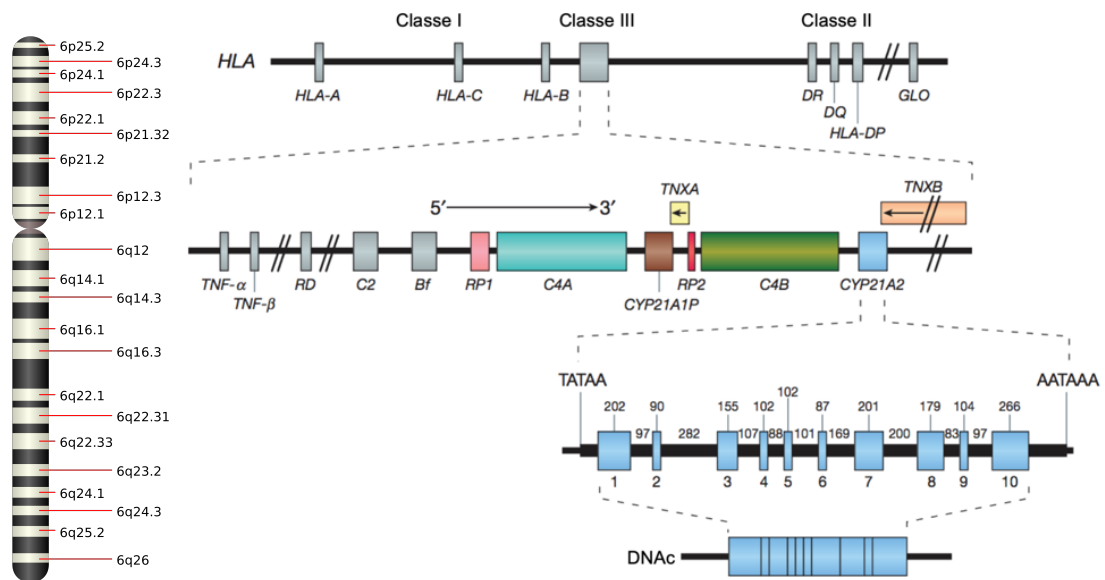
Fonte: Adaptado³.

Bases genéticas da deficiência da 21 α -hidroxilase

A D-21OH (OMIM 201910) possui herança autossômica recessiva e está relacionada às alterações do gene humano *CYP21A2*, mapeado no cromossomo 6 (6p21.3). O gene faz parte da estrutura genética que codifica o complexo principal de histocompatibilidade humana, ou MHC (do inglês: *major histocompatibility complex*).

Na D-21OH ocorre recombinação gênica do *CYP21A2* e seu pseudogene, *CYP21A1P*, com o qual possui uma homologia de 98%. O pseudogene se torna inativo devido à presença de onze mutações deletérias. Quando sequências que normalmente estão presentes no pseudogene são transferidas ao gene ativo, elas tornam o gene ativo incapaz de decodificar uma enzima normal.⁷ O gene e seu pseudogene são arranjados em repetições *in tandem* com outros genes *C4* (*C4A* e *C4B*). Os genes *C4/CYP21A2* são flanqueados pelos genes *RP* (*RP1* e *RP2*), que são teloméricos, e pelos genes relacionados à glicoproteína tenascina (*TNXA* e *TNXB*), que são centroméricos. Com exceção do *C4*, cada um desses genes funcionais (*RP1*, *CYP21A2* e *TNXB*) tem o seu pseudogene, todos com grande homologia. Os genes *RP*, *C4*, *CYP21* e *TNX* compõem um módulo gênico, nomeado RCCX. A maioria é bimodular (*RP1-C4-CYP21A1P-TNXA-RP2-C4-CYP21A2-TNXB*) (**Figura 2**), mas haplótipos monomodulares e trimodulares são frequentes na população, assim como variações do número de cópias de *C4*, *CYP21* e *TNX*.^{8,9,10}

Figura 2 – Localização do gene *CYP21A2* no sistema antígeno leucocitário HLA (do inglês: *human leucocyte antigen*) de classe III, no *locus* do complexo principal de histocompatibilidade, no braço curto do cromossomo 6; os demais genes *RP*, *C4* e *TNX* fazem parte de um mesmo bloco genético chamado módulo RCCX.



Fonte: Adaptado¹⁰.

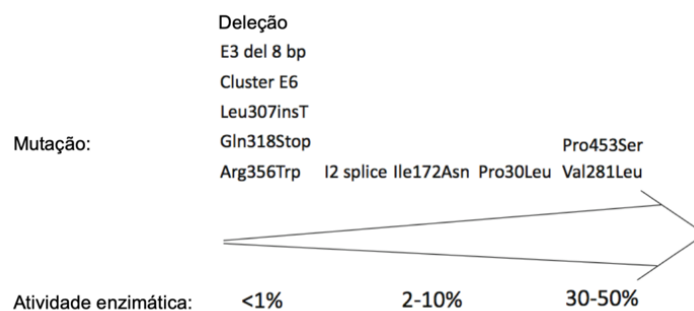
Diferentemente de outras doenças recessivas nas quais a mesma mutação em homozigose ocorre nos dois alelos, na D-21OH, os doentes podem ser heterozigotos compostos,

ou seja, ter mutações diferentes nos alelos materno e paterno, o que contribui para um amplo espectro de variabilidade clínica.

Há praticamente dois mecanismos genéticos principais envolvidos na D-21OH: recombinação assimétrica, que é uma troca aleatória de material genético durante a meiose; e conversão gênica, que é a transferência de uma sequência de um gene para outro, sendo que o gene doador permanece inalterado e não há perda de material genético. Os demais mecanismos que podem ocorrer são eventos de microconversão gênica. Essa alta identidade entre os genes *CYP21* e a organização em cadeia dos genes duplicados nessa região do cromossomo favorecem o emparelhamento desigual durante a meiose e, conseqüentemente, a ocorrência de eventos de *crossing-over* desigual, podendo gerar alelos duplicados ou deletados.^{11,12,13}

Em geral, as mutações estão associadas às formas clínicas da D-21OH: o grau de comprometimento funcional previsto por determinada mutação geralmente corresponde à gravidade clínica observada em um dado paciente (**Figura 3**)¹⁴. Porém, em cerca de 20% dos casos, o genótipo não prevê o fenótipo com precisão^{15,16}. Mecanismos têm sido aventados para tentar explicar essa discordância, como a possibilidade de uma atividade extra adrenal da 21-hidroxilase. Além das mutações próprias do gene *CYP21A2*, outros genes podem também afetar o fenótipo, modificando a ação dos esteroides ou o balanço de sal.¹⁷

Figura 3 – Correlação entre o genótipo e o grau da deficiência enzimática na deficiência da 21-hidroxilase (fenótipo)



Fonte: Adaptado¹⁴.

Apresentação clínica da deficiência da 21-hidroxilase

A D-21OH se divide nas formas clássica e não clássica. A forma clássica é rara e tem uma incidência global de 1:15.000 nascidos vivos¹⁸, já a forma não clássica é bem mais prevalente, cerca de 1% na população¹⁹. A deficiência enzimática praticamente completa ocorre em 75% dos casos da forma clássica, resultando numa forma mais grave perdedora de sal. Os

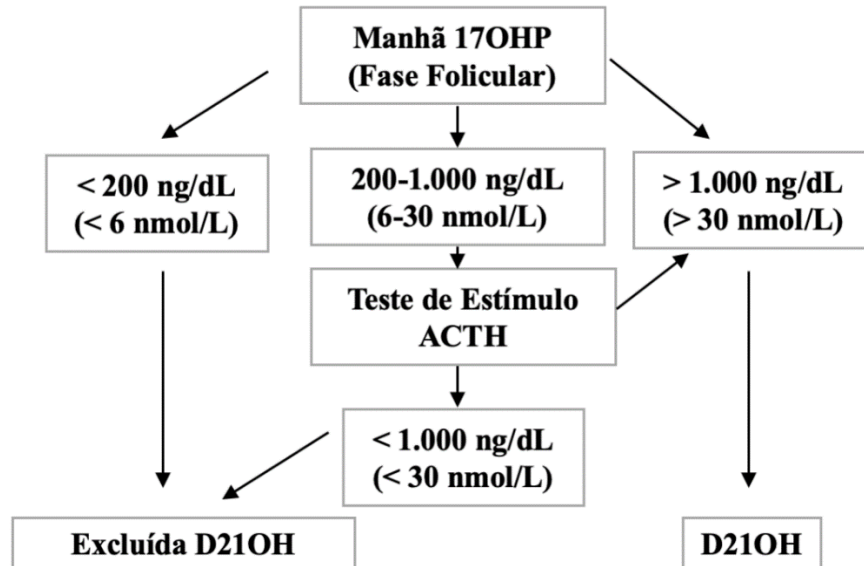
demais doentes com a forma clássica, com atividade enzimática residual (>1%), possuem a forma virilizante simples. Na forma não clássica, há atividade enzimática maior que 20%^{17,20}.

Na forma clássica perdedora de sal, há deficiência mineralocorticoide evidente, manifestada por sinais e sintomas precoces, como o não ganho de peso no recém-nascido e sucção débil. Posteriormente, hipercalemia acompanhada de hiponatremia, com ou sem sinais clínicos de desidratação. Nas meninas, já nas primeiras semanas de vida intrauterina, ocorre a virilização da genitália externa. Os recém-nascidos do sexo masculino não têm sinais clínicos evidentes ao nascimento e, por isso, estão particularmente sob maior risco de morte. A crise adrenal, ou crise de perda de sal, nessas crianças, leva a vômitos, choro fraco, desidratação, letargia e choque.²¹ A forma virilizante simples caracteriza-se por ambiguidade genital nos fetos do sexo feminino e por sinais de virilização precoce em indivíduos do sexo masculino não tratados.

A confirmação diagnóstica na forma clássica é realizada através da dosagem sérica de precursores adrenais acumulados e andrógenos em excesso, do ACTH e da atividade de renina²². Atualmente, a detecção precoce da forma clássica, ainda em recém-nascidos, é possível devido aos programas de triagem neonatal, que incluem a pesquisa da D-21OH. A triagem consiste na dosagem do precursor 17OHP no sangue de calcanhar de recém-nascidos, preferencialmente entre o terceiro e quinto dia de vida. O objetivo principal é evitar os sinais e sintomas da perda de sal, evitar o registro civil incorreto das meninas com genitália ambígua e também possibilitar o diagnóstico precoce da forma virilizante simples em meninos²³.

Na forma não clássica, os indivíduos podem ser assintomáticos ou apresentar sinais e sintomas clínicos mais tarde na infância, na adolescência ou apenas na vida adulta.²⁴ Um procedimento importante para o diagnóstico da forma não clássica diante da suspeita clínica é o teste sob estímulo da cortrosina (ACTH exógeno intravenoso), no qual são dosados os níveis plasmáticos da 17OHP, entre outros hormônios adrenais. O valor de referência da 17OHP após o teste funcional (**Figura 4**) varia, segundo a literatura, de 1000 a 1500 ng/dL (método quimioluminescência), tendo em vista a inclusão ou não da distinção entre indivíduos com a forma não clássica e heterozigotos²².

Figura 4 – Fluxograma para o diagnóstico da forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase (D-21OH) após teste de estímulo com o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) sintético; 17-hidroxiprogesterona (17OHP).



Fonte: Adaptado²².

Objetivos gerais do tratamento na faixa etária pediátrica

O manejo da forma clássica da D-21OH é sempre complexo e individualizado. Na faixa etária pediátrica, os principais objetivos do tratamento são evitar a crise adrenal e permitir crescimento e puberdade normais. A forma não clássica exige tratamento apenas nos casos em que ocorre pubarca precoce, alterações do crescimento e avanço significativo da idade óssea²⁴.

Infância

Em recém-nascidos, o foco está na condução adequada dos quadros de genitália ambígua, bem como no diagnóstico e tratamento precoces da forma clássica perdedora de sal em ambos sexos. A síntese dos mineralocorticoides é controlada pelo sistema renina-angiotensina e pela alça de regulação dependente do potássio. A secreção de renina é estimulada por uma gama de fatores, sendo a perfusão arterial renal a mais importante. A reposição mineralocorticoide pela fludrocortisona 0,05 a 0,2 mg/dia visa reestabelecer o equilíbrio hidroeletrólítico, mas sem retenção excessiva de sal, e sua necessidade é maior na primeira infância em relação à adolescência. O uso do cloreto de sódio é preconizado nos primeiros meses de vida²².

O glicocorticoide de escolha para os pacientes pediátricos é a hidrocortisona, que é o nome farmacêutico do próprio cortisol. A dose preconizada é de 10-15 mg/m²/dia²². Essa dose

excede, provavelmente, o nível fisiológico da secreção do cortisol na maioria dos indivíduos, que é cerca de 6-9 mg/m²/dia. Assim, doses ligeiramente suprafisiológicas são necessárias para suprimir adequadamente os níveis dos andrógenos adrenais. A meia-vida curta da hidrocortisona minimiza a supressão do crescimento e outros efeitos não desejáveis que são frequentemente observados com os glicocorticoides mais potentes^{25,26}.

O uso de doses excessivas de hidrocortisona pode levar à queda da velocidade de crescimento e impacto na altura, sendo esse efeito mais importante nas fases de crescimento rápido, como ocorre no primeiro ano de vida^{27,28}. Apesar de a literatura preconizar, no passado, doses em torno de 15-20 mg/m²/dia de hidrocortisona²⁹, evidências atuais apontam para uma necessidade de glicocorticoide menor, principalmente nos lactentes²⁸. Entre 0-2 anos, principalmente nos primeiros seis meses de vida, a chance de o hiperandrogenismo comprometer o crescimento é provavelmente pequeno, dado que o crescimento nessa fase não é muito sensível aos andrógenos^{30,31}.

Quando não tratadas, crianças doentes podem apresentar virilização pós-natal progressiva em ambos os sexos: aumento do fálus nas meninas e sintomas evidentes de pseudopuberdade precoce nos meninos (aumento do pênis sem correspondente aumento testicular), além de pubarca, hirsutismo, acne, hipertrofia muscular e engrossamento irreversível da voz. Quando o diagnóstico ocorre mais tardiamente, e conseqüentemente também a terapia glicocorticoide, a idade óssea poderá estar bem avançada e a altura final poderá ser também comprometida. Uma grande proporção de crianças, incluindo meninas, desenvolve puberdade precoce gonadotrofina dependente ou central (PPC). A fisiopatologia da PPC está relacionada à ativação do eixo HH pelo hiperandrogenismo crônico e os fatores estudados associados ao seu desencadeamento são o avanço de idade óssea, diagnóstico tardio e controle clínico insatisfatório. Os pacientes com PPC que recebem tratamento com análogos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) parecem apresentar um melhor desfecho quanto à altura final³²⁻³⁵.

Essa abordagem dos casos de genitália ambígua deve ser sempre multidisciplinar. A primeira genitoplastia nas meninas com a forma clássica é geralmente realizada no primeiro ano de vida, por cirurgião experiente³⁶.

Adolescência

Adesão ao tratamento na doença crônica, independentemente da idade e fase do desenvolvimento, está provavelmente relacionada à frequência de administração de

medicamentos, à intensidade da terapia, aos efeitos colaterais e ao nível de otimismo e apoio oferecido pelos membros da família.

Contudo, na adolescência, a não adesão à terapia medicamentosa parece explicar apenas em parte as dificuldades no manejo dos pacientes com D-21OH. Adolescência e início da puberdade estão associados a modificações na farmacocinética da hidrocortisona. O aumento do hormônio do crescimento (GH) e das concentrações do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) levam à diminuição da atividade da isoenzima tipo 1 da 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase, que promove a redução da cortisona a cortisol em vários tecidos metabólicos, resultando no aumento do *clearance* e volume de distribuição, sem alterações na meia-vida^{29,30,37-39}. Assim, as doses de tratamento na puberdade são frequentemente mais elevadas⁴⁰.

Adolescentes do sexo masculino com histórico de tratamento inadequado e elevação persistente do ACTH podem ter tumores intratesticulares de restos adrenais, com comprometimento da espermatogênese e da produção de testosterona na vida adulta. O diagnóstico precoce é fundamental na prevenção de lesões irreversíveis e infertilidade⁴¹.

Assim, o subtratamento, de forma geral, pode levar ao hiperandrogenismo, virilização e avanço progressivo da idade óssea. Mas o hipercortisolismo pode levar ao Cushing iatrogênico, com obesidade e perda de massa óssea. Tanto o excesso de glicocorticoide quanto o hiperandrogenismo estão correlacionados ao maior risco de baixa estatura na vida adulta. Dessa forma, o maior desafio terapêutico na D-21OH durante a adolescência é assegurar adesão, controlando adequadamente o incremento noturno do ACTH, mas sem os efeitos adversos do tratamento glicocorticoide⁴².

Glicocorticoides de longa ação podem ser usados em adolescentes, mas apenas aqueles já com estatura final (prednisolona e prednisona 2-4 mg/m²/dia ou dexametasona 0,25-0,37 mg/m²/dia)⁴³.

Monitorização da terapia glicocorticoide e supressão androgênica

Dosagem dos esteroides e controle metabólico na D-21OH

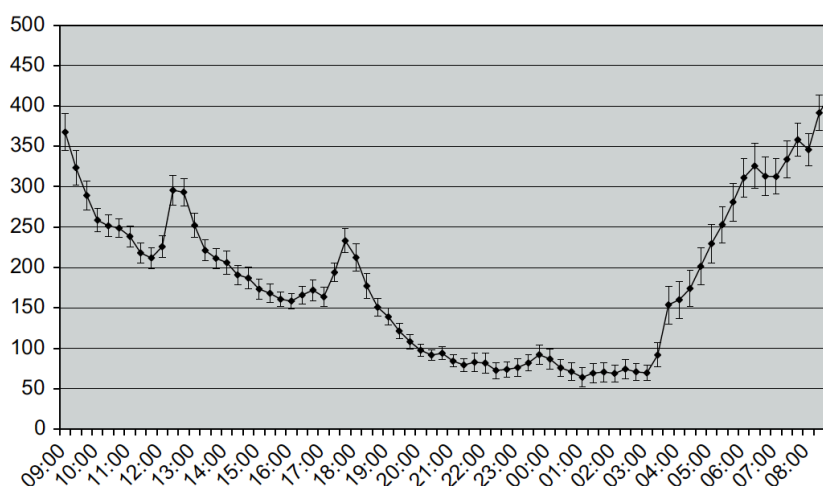
Espectrometria de massa com cromatografia líquida é a técnica analítica padrão ouro para as dosagens séricas hormonais na D-21OH. Contudo, outros métodos são ainda largamente utilizados por terem menor custo, porém apresentam reatividade cruzada da 17OHP sérica com os demais esteroides. Isso foi observado pelo estudo da seletividade de ensaios, no qual interferências foram causadas por outras substâncias que compunham a matriz amostral⁴⁴.

Devido a essa baixa seletividade dos ensaios comumente utilizados, na D-21OH, é comum observar níveis séricos de 17OHP frequentemente acima do intervalo de referência em doentes adequadamente tratados. Assim, a dosagem da 17OHP sérica pelos métodos habituais não é, isoladamente, um bom parâmetro de controle metabólico, e sua análise deve ser realizada em conjunto com os demais esteroides que têm menos interferências (androstenediona e testosterona) e paralelamente aos parâmetros clínicos (exame físico, avaliação da curva de crescimento e da idade óssea).

Farmacocinética e biodisponibilidade do acetato de hidrocortisona oral

O tratamento da D-21OH durante toda infância e adolescência até o fechamento das epífises ósseas é realizado com o acetato de hidrocortisona oral. Análises prévias da farmacocinética da droga apontam para que seja utilizada três vezes ao dia, ajustada ao peso e após alimentação. Todavia, o perfil de biodisponibilidade da droga nessa posologia é muito diferente da produção endógena, uma vez que, em pessoas saudáveis, o cortisol segue o ritmo circadiano (**Figura 5**). A secreção endógena de cortisol no córtex adrenal segue um padrão diurno, com níveis plasmáticos elevados e crescentes de cortisol no início da manhã (aproximadamente 05:00-08:00 horas), níveis intermediários à tarde, níveis baixos à noite. Existe, por conseguinte, uma necessidade clínica de um fármaco que apresente um perfil de distribuição mais próximo ao ritmo circadiano^{45,46,47}.

Figura 5 – Ritmo circadiano do cortisol (em nmol/L), de um indivíduo adulto.

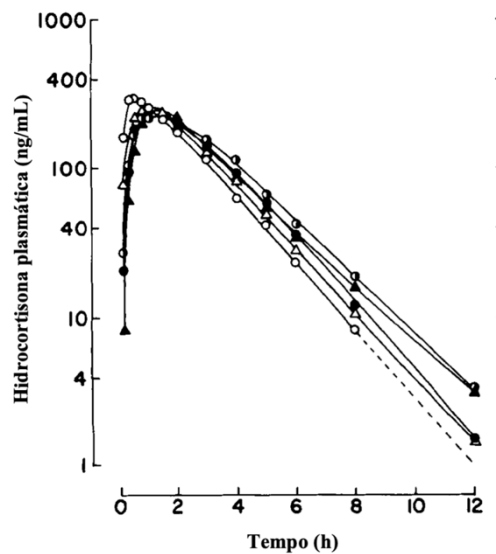


Fonte: Adaptado⁴⁵.

O acetato de hidrocortisona oral é completamente absorvido e apresenta uma boa biodisponibilidade para a circulação. Em estudo prévio, em adultos, após uso de 20 mg, o pico

da concentração plasmática variou de meia hora a uma hora e meia, para todo tipo de formulação oral (**Figura 6**). Os parâmetros farmacocinéticos foram similares para dosagens até 40 mg e as concentrações iniciais de hidrocortisona no plasma foram diretamente relacionadas ao incremento da dose. O pico da droga é reduzido com jejum^{48,49,50,51}.

Figura 6 – Média das concentrações plasmáticas de hidrocortisona (ng/mL) em adultos saudáveis (n=15) durante doze horas, após uso de 20 mg em suspensão (círculo vazado) ou quatro formulações em cápsulas de hidrocortisona bioequivalentes.



Fonte: Adaptado⁴⁹.

Além disso, pode haver grande variabilidade interindividual na farmacocinética da hidrocortisona, devido à presença de indivíduos que são metabolizadores rápidos da droga. Nesses, o aumento da dosagem da medicação, por exemplo, em duas vezes, não reflete em aumento proporcional esperado do cortisol total⁵².

Novas drogas no tratamento da D-21OH

Infusão parenteral de múltiplas doses de hidrocortisona ou esquema oral com formulações com liberação ao longo do dia e lenta administrada ao dormir, como alternativa à terapia convencional, poderia de fato mimetizar o ritmo circadiano do cortisol, diminuindo o pico do ACTH noturno e aumentando o cortisol pela manhã. Contudo, resultados recentes de um estudo clínico de fase 3 com o fármaco, em 122 indivíduos adultos com D-21OH, não mostraram que esse tratamento alternativo é superior ao convencional^{45,53-57}.

Na literatura, outras drogas são descritas para controlar o hiperandrogenismo em conjunto com a terapia glicocorticoide em adultos: anticoncepcionais orais, inibidores da síntese adrenal e antagonista do receptor androgênico⁵⁸⁻⁶⁰.

Variabilidade da resposta ao glicocorticoide

A dificuldade de controle na D-21OH é amplamente reconhecida. Além das questões relacionadas à própria farmacocinética da hidrocortisona e adesão ao tratamento, o que se observa na prática no acompanhamento dos pacientes são padrões diferentes de resposta clínica à terapia glicocorticoide. De fato, na população geral, a sensibilidade glicocorticoide varia entre os indivíduos e até mesmo no mesmo indivíduo, conforme o tecido e a fase do ciclo celular. A variabilidade da sensibilidade ao glicocorticoide parece ser determinada por diversos fatores, tais como: polimorfismos genéticos, concentração intracelular do hormônio, níveis de expressão do receptor para glicocorticoide (do inglês, *glucocorticoid receptor*, GR), heterodimerização das isoformas GR α /GR β , interação glicocorticoide-receptor-proteínas e fatores transcricionais⁶¹.

A própria dosagem sérica do cortisol basal é utilizada para avaliar o efeito da exposição ao glicocorticoide, mas esse é também determinado pela fração ligada à globulina transportadora de cortisol (do inglês, *corticosteroid-binding globulin*, CBG). As concentrações plasmáticas de CBG, em condições fisiológicas, mostram pequenas variações diurnas e diferenças pouco significativas de acordo com idade, sexo e ciclo menstrual. Terapia com estrógenos e gravidez estão relacionadas a maiores níveis de CBG e níveis baixos são observados na hipoproteinemia, síndrome nefrótica, cirrose hepática, Síndrome de Cushing, uso terapêutico de glicocorticoide e deficiência da vitamina B12. Em condições de extrema gravidade clínica são descritos níveis baixos de CBG⁶¹.

A disponibilidade do glicocorticoide intracelular depende da atividade e dos níveis de expressão da enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase (11 β -HSD), que catalisa interconversão de formas ativas a inativas de glicocorticoides. A 11 β -HSD-1 é expressa principalmente no fígado, pulmões, tecido adiposo e cérebro. A 11 β -HSD-2 é encontrada predominantemente nos órgãos-alvos para aldosterona, como rins, cólon, glândulas sudoríparas e placenta, impedindo ligação de glicocorticoides ao receptor mineralocorticoide (do inglês, *mineralocorticoid receptor*, MR)⁶¹.

Nos órgãos e tecidos, os glicocorticoides exercem efeito através do GR e seus níveis são determinados pela sensibilidade do receptor. Mudanças transitórias da sensibilidade do receptor

podem ocorrer durante diversas doenças infecciosas, neoplasias, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e doenças autoimunes⁶².

Na D-21OH, o estudo da funcionalidade do GR, quanto ao número de receptores e também quanto à afinidade de ligação, não mostrou diferenças com relação à população saudável⁶³. Contudo, a sensibilidade ao glicocorticoide possui uma grande variação interindividual na população saudável⁶⁴, o que pode ocorrer também na D-21OH. Parte dessa variação poderia ser, portanto, explicada por questões genéticas relacionadas ao GR^{65,66,67}.

2.2 Receptor Glicocorticoide

O GR é codificado pelo gene *NR3C1* (*Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1*), que foi mapeado no cromossomo 5 (5q31.3) em 1985⁶⁸. Pertence à superfamília de receptores do tipo nuclear, que inclui receptores para MR, estrógenos, progestágenos e andrógenos, bem como vitamina D e hormônios tireoidianos.

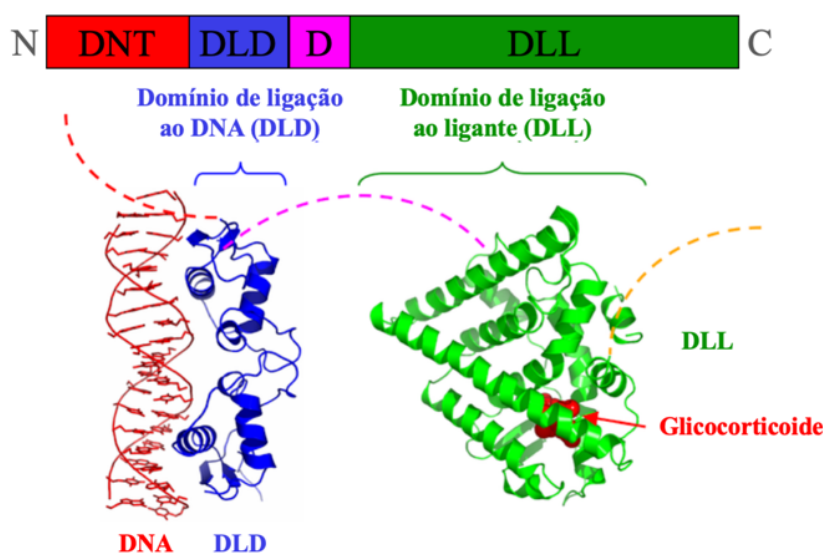
O GR é uma proteína modular de 777 aminoácidos e, como todos os receptores nucleares, está organizado em três domínios funcionais principais: 1) um domínio n-terminal (DNT) de transativação (com função de ativação, FA-1); 2) um domínio central de ligação ao DNA (DLD); e 3) um domínio c-terminal de ligação ao ligante glicocorticoide (DLL), como detalhado na **Figura 7**. Além do seu papel no reconhecimento de ligantes, o DLL contém uma função de ativação (FA-2) que é regulada pela ligação a hormônios. Entre as regiões DLD e DLL, há uma pequena região chamada de dobradiça que faz a conexão entre as demais e que possui diversas outras funções.

Assim, o GR é um fator de transcrição intracelular conhecido por regular direta ou indiretamente genes-alvo envolvidos na homeostase da glicose, renovação óssea, diferenciação celular, maturação pulmonar e inflamação. A regulação é mediada pela ligação do glicocorticoide ao receptor, dimerização do receptor e recrutamento do coativador. Na ausência de ligante, o GR é retido no citoplasma por associação com proteínas que se ligam ao DLL. A ligação ao glicocorticoide leva à dimerização e a translocação do receptor para o núcleo. No núcleo, o GR liga-se aos elementos promotores e pode ativar ou inibir a transcrição, dependendo do contexto⁶⁹.

A maioria das ações dos glicocorticoides é de fato mediada por ligação e ativação do GR, embora algumas ações não genômicas importantes sejam conhecidas. A regulação direta com o gene, ativando ou reprimindo sua expressão, é chamada de transativação. O processo indireto, que é a transrepressão, ocorre quando os GRs atuam sobre outros fatores de transcrição. O efeito terapêutico anti-inflamatório é decorrente do mecanismo de transrepressão

do GR, enquanto a transativação é responsável pela maior parte dos efeitos colaterais do uso do glicocorticoide, embora existam exceções. Por exemplo, alguns efeitos colaterais dos glicocorticoides são decorrentes de mecanismos mistos, como a hiperglicemia e a perda de massa muscular⁷⁰.

Figura 7 – Estrutura 3D de um receptor nuclear, mostrando os seus três domínios principais: N-terminal (DNT), domínio de ligação do DNA (DLD), região de dobradiça (D), domínio de ligação ao ligante (DLL) C-terminal.



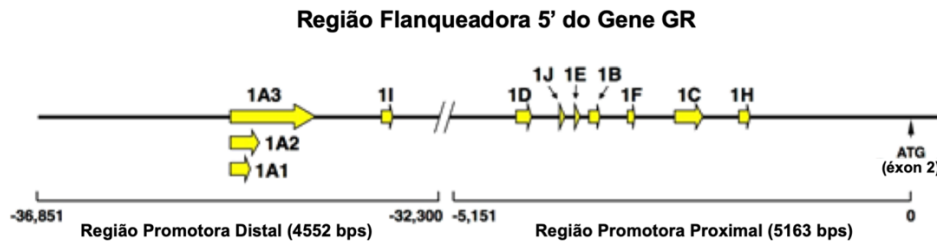
Fonte: Adaptado⁶⁹.

Gene do receptor glicocorticoide humano: estrutura, transcrição e tradução

Os genes são segmentos de DNA, nos quais a sequência das quatro bases nitrogenadas (A, C, G, T) constitui o código genético. Cada sequência de três bases forma um códon, elemento que codifica um aminoácido. O DNA humano é de cadeia dupla e o número total de pares de bases (bp) é igual ao número de nucleotídeos numa das cadeias.

O gene *NR3C1* possui um comprimento de 157.582 bases e é formado 13 exons não codificadores, denominados 1_{A-J}, excluindo a letra “G”: 1_{A1}, 1_{A2}, 1_{A3}, 1_B, 1_{C1}, 1_{C2}, 1_{C3}, 1_D, 1_E, 1_F, 1_H, 1_I e 1_J. Esses atuam como promotores alternativos e, por conseguinte, o gene pode produzir 13 diferentes transcritos com base na região promotora (**Figura 8**). A região 1 tem a numeração desordenada devido à descoberta dos exons em momentos históricos diferentes. O gene possui 8 exons codificadores de proteínas, numerados de 2 a 9⁷¹.

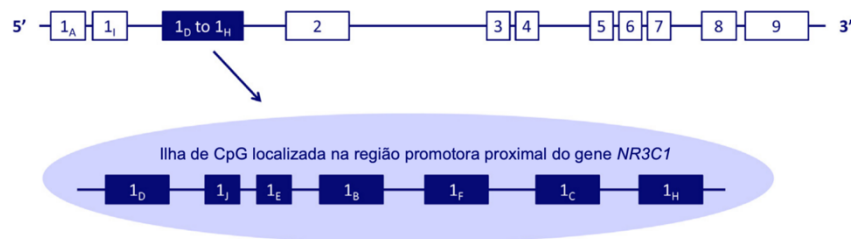
Figura 8 – Região promotora do gene *NR3C1* do receptor glicocorticoide: 1_{A1} , 1_{A2} , 1_{A3} e 1_I estão localizados na região promotora distal, abrangendo ~ 32.000-36.000 bps, enquanto as posições 1_B , 1_{C1-3} , 1_D , 1_E , 1_F , 1_H e 1_J estão na região promotora proximal, localizada a montante por ~ 5.000 bps.



Fonte: Adaptado⁷¹.

Os exons 1_D , 1_J , 1_E , 1_B , 1_F , 1_{C1-3} e 1_H estão localizados dentro de uma ilha de várias sequências de citosina-guanina (do inglês, *cytosine connected by a phosphodiester bond to guanine*, CpG) (**Figura 9**), que são locais de metilação do DNA e, portanto, sujeitas a alterações epigenéticas, abrangendo 3000 pares de bases (3 kb), ao longo da região promotora proximal, onde se inicia a transcrição do gene⁷².

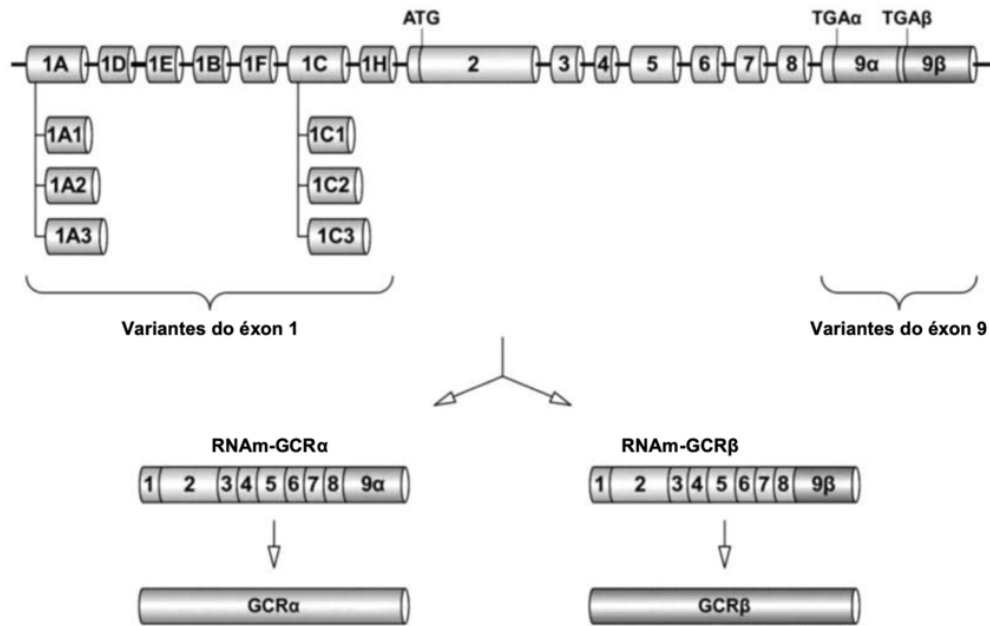
Figura 9 – Estrutura do gene *NR3C1* no sentido 5-3, onde estão sinalizadas ilhas de sequências de citosina-guanina (ilhas de CpG) sujeitas às alterações epigenéticas.



Fonte: Adaptado⁷².

Os exons centrais do gene *NR3C1* são numerados 2 a 8. O exon 9 determina duas variantes traduzidas de RNA mensageiro, por *splicing* alternativo: isoforma α e isoforma β (**Figura 10**). As isoformas são idênticas em 727 aminoácidos, a forma α possui 50 e a forma β 15 aminoácidos adicionais. Embora as isoformas sejam 94% idênticas, a α é a única capaz de se ligar aos glicocorticoides e ativar a transcrição gênica^{73,74}.

Figura 10 – Estrutura do gene *NR3C1* com seus exons variantes, levando ao *splicing* alternativo do GR e às isoformas α e β .

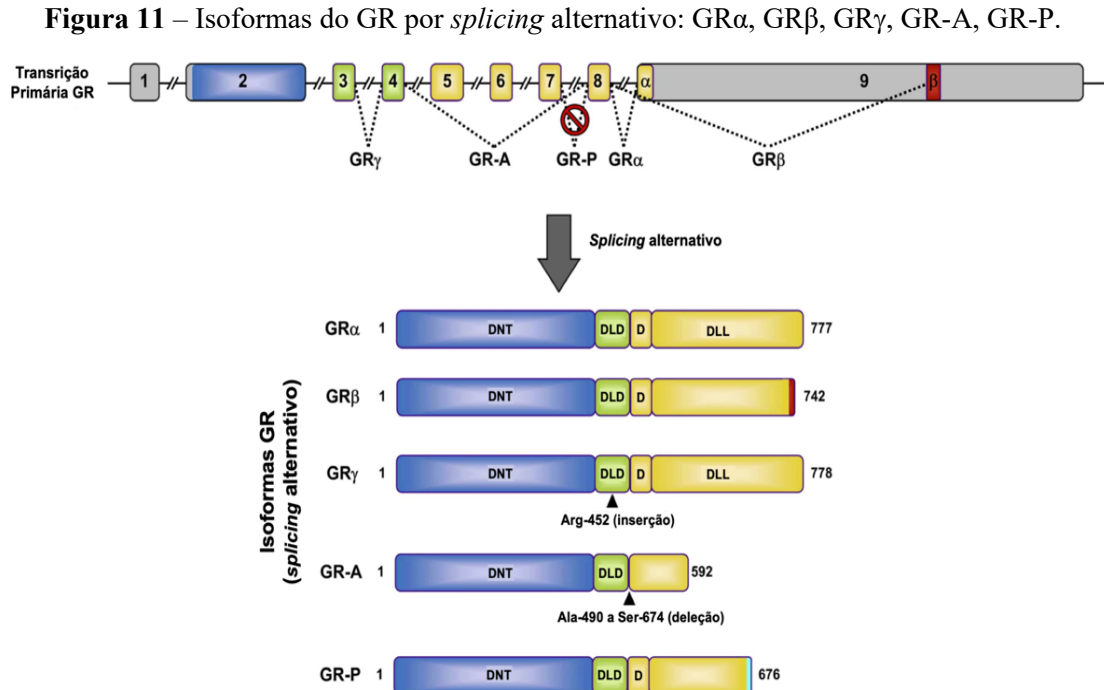


Fonte: Adaptado⁷³.

Na infância, a resistência ao glicocorticoide relacionada à asma é um reconhecido problema clínico. Dentre os mecanismos envolvidos estudados, se destaca a maior expressão da variante β do GR⁷⁵. Outras patologias associadas à variante são Leucemia Linfoblástica Aguda, Colite Ulcerativa e neoplasias diversas. As isoformas podem se diferenciar de acordo com as diferentes áreas promotoras descritas acima. Foi demonstrado que uma alta proporção de exons 1_{A3}, por exemplo, aumenta a quantidade da variante GR- β ⁷⁶.

Outras formas variantes são γ (gama), P e A (**Figura 11**). A primeira tem uma inserção do aminoácido alalina, devido ao *splicing* alternativo no limite do exon 3-4. Essa isoforma é amplamente expressa nos tecidos, representando cerca de 4-8% do total dos GR, mas possui menor atividade transcricional que GR- α . Expressão de níveis elevados de receptor contendo a variante γ tem sido associada à resistência ao glicocorticoide em crianças com leucemia linfoblástica aguda. A isoforma P tem apenas 676 aminoácidos e é codificada por um RNA mensageiro expresso a partir dos exons 1-7, mas faltam os exons 8 e 9.⁷⁴ Essa variante foi descrita em tecidos normais e patológicos, como na Síndrome de Cushing, Mieloma Múltiplo, Leucemia Linfoblástica e Linfoma não-Hodgkin; e parece estar associada à grande resistência ao glicocorticoide. GR-A é um outro produto em que ocorre à junção dos exons 4 e 8, com deleção de 185 aminoácidos do domínio DLL, codificados pelos exons 5-7. Outras 21 variantes têm sido investigadas e, apesar de numerosos estudos apontarem para uma associação de

variantes de *splicing* alternativo com determinadas doenças, suas funções exatas ainda precisam ser elucidadas^{77,78}.

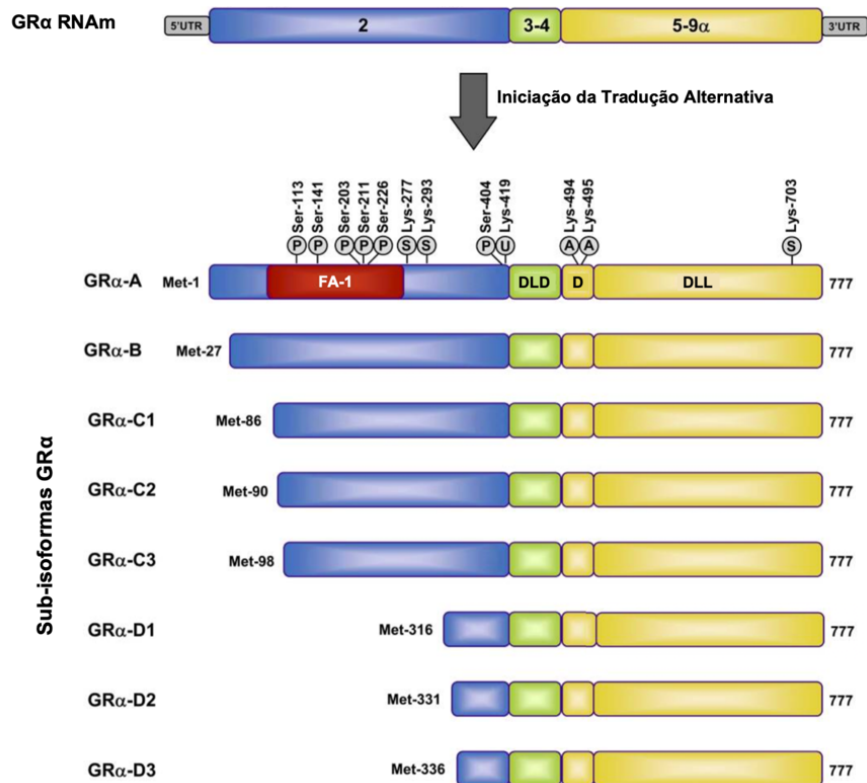


Fonte: Adaptado⁷⁸.

Além das variantes por *splicing*, há outras diferentes geradas por tradução alternativa da proteína. Essas isoformas têm regulação gênica diferenciada, produzindo diferenças funcionais. Um mesmo produto GR- α pode produzir oito diferentes subisoformas. O que ocorre é que códons de iniciação AUG no exon 2 do transcrito GR dão origem a oito variantes GR- α com um terminal n progressivamente mais curto. Essas subisoformas do receptor são designadas GR- α _{A, B, C1, C2, C3, D1, D2, D3} (**Figura 12**). Outras subisoformas, pelo mesmo mecanismo, também podem advir das variantes GR- β , γ , P, etc. Assim, o início alternativo também da tradução a partir do RNA mensageiro GR- α , produz uma coorte adicional de diversas proteínas GR, adicionando heterogeneidade ao GR^{78,79}.

Modificações da proteína GR pós tradução podem ocorrer através dos processos já descritos de fosforilação⁸⁰, sumoilação⁸¹ e acetilação⁸² de determinados resíduos de aminoácidos. Tais mudanças promovem alteração da atividade do GR e permitem um ajuste fino da sinalização glicocorticoide, dependendo do contexto fisiológico⁷⁹.

Figura 12 – Subisoformas GR- α geradas por iniciação de tradução alternativa e sítios de modificação pós-tradução.



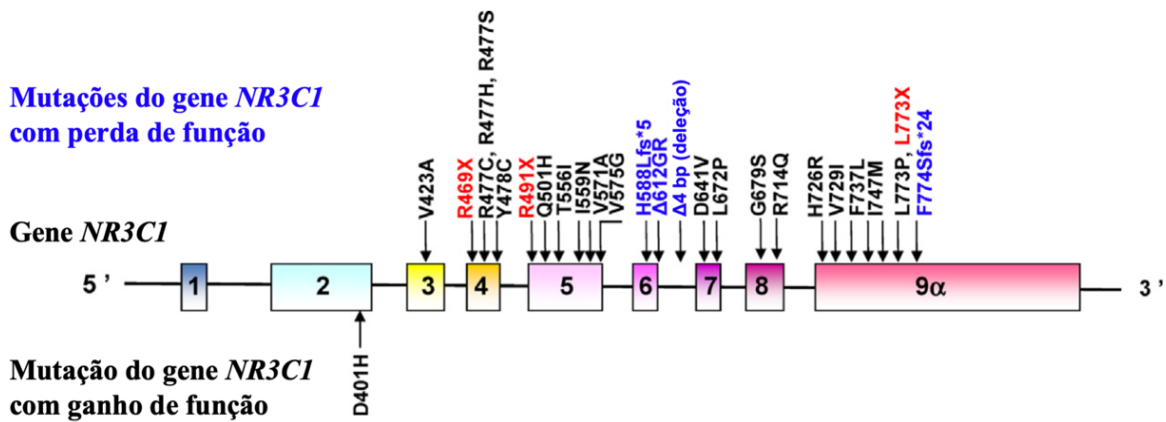
Fonte: Adaptado⁷⁸.

Mutações, deleções e inserções no gene *NR3C1*

Várias modificações do código genético do GR já foram descritas, associadas a uma entidade clínica bastante rara, esporádica ou familiar, que é uma síndrome de resistência generalizada primária aos glicocorticoides chamada de Síndrome de Chrousos (**Figura 13**). É caracterizada por baixa sensibilidade de todos os tecidos do organismo ao cortisol, resultando em elevadas concentrações de ACTH e do próprio cortisol, hipersecreção também de mineralocorticoides e andrógenos. Indivíduos acometidos podem ser assintomáticos ou apresentar um espectro variado de manifestações clínicas: obesidade e transtornos psiquiátricos, a manifestações persistentes do excesso de mineralocorticoide (hipertensão e alcalose hipocalêmica) e excesso de andrógenos (genitália ambígua, puberdade precoce, acne, hirsutismo, infertilidade)⁸³.

Não há muitos estudos na população com HAC quanto à frequência dessas mutações do gene *NR3C1*. Estudos em indivíduos assintomáticos com hiperplasia adrenal (incidentalomas) e sintomas sugestivos de resistência ao glicocorticoide mostraram, contudo, maior frequência de formas heterozigotas em relação à população geral saudável (estudo francês MUTA-GR)⁸⁴.

Figura 13 – Mutações já identificadas do gene do receptor glicocorticoide, *NR3C1*: em vermelho, mutações de ponto; em azul, mutação por mudança da matriz de leitura; e em preto, mutação de sentido trocado.



Fonte: Adaptado⁸³.

2.3 Polimorfismos do Gene *NR3C1* e a Resistência ao Glicocorticoide

O genoma humano contém inúmeras alterações genéticas, incluindo variações de nucleotídeo único (do inglês, *single nucleotide variation*; SNV), que influenciam a resposta individual a fatores ambientais, e suscetibilidade a várias doenças ou comorbidades. Essas variações estão presentes a cada 300 pares de bases, podendo ser de dois tipos: sinônima, em que as substituições não alteram a decodificação de aminoácidos (lembrando que diferentes códons podem decodificar um mesmo aminoácido); e não sinônima, quando as substituições alteram. Isso pode ocorrer também dentro de uma área intrônica, porção do gene que é removida antes da tradução para a proteína. Introns podem modificar a expressão do RNA mensageiro dos genes próximos, afetando o *splicing*, estabilidade do RNA e acesso de fatores de transcrição a elementos reguladores de genes. Algumas dessas SNVs são extremamente raras no gene *NR3C1* e se correlacionam a manifestações clínicas muito peculiares, prejudicando as funções do GR, sendo reconhecidas como mutações patológicas de ponto, como descrito anteriormente, na síndrome de resistência ao glicocorticoide. Outras variações de nucleotídeo, chamadas de polimorfismos, são bem mais frequentes e são, de forma geral, responsáveis pela variabilidade interindividual da resposta ao glicocorticoide⁸⁵.

Polimorfismos de nucleotídeo único e sua herança em blocos

O polimorfismo mais comum no genoma humano é o de nucleotídeo único (SNP). A grande maioria dos SNPs têm dois alelos, que apresentam uma substituição de uma base nitrogenada por outra (por exemplo, C por T ou A por G). Assim, há um alelo designado como principal e o outro como menor, com base na frequência observada na população geral. Como o DNA humano é diploide (os cromossomos são de origem materna e paterna), o indivíduo pode ter um dos três genótipos para cada polimorfismo: homocigoto para o principal alelo, heterocigoto ou homocigoto para o alelo menor.

Existem diversos polimorfismos relacionados ao gene do GR, que são herdados de forma previsível nas populações. Os mais relevantes são: *Tth1111*, *ER22*, *23EK*, *N363S*, *BclII* e *9β*.^{86,87}

Desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium*)

Segundo a terceira lei de Mendel, os genes são transmitidos de forma independente. No entanto, ao longo de gerações, regiões localizadas próximas, num mesmo cromossomo, são mais propensas a ser herdadas juntas, pois há menor probabilidade de terem sido recombinadas separadamente. Esse conceito é chamado de *linkage*.

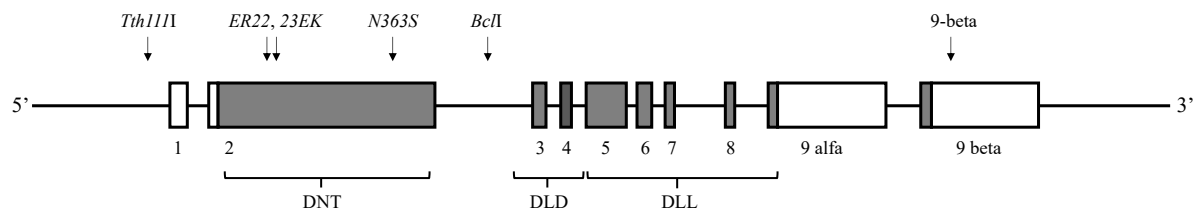
Em genética populacional, o *linkage disequilibrium*, ou seja, o desequilíbrio de ligação (DL) se refere à correlação entre alelos específicos que não foram separados por recombinação histórica. A medida do DL é matematicamente dada por D' e r^2 , variando entre 0 e 1, onde D' e $r^2=1$ implicam que os alelos estão perfeitamente correlacionados. Essa combinação de alelos em uma fita de DNA é chamada de haplótipo. Regiões de alto DL são delimitadas por regiões de recombinação (*hotspots* de recombinação), que são chamados de blocos de haplótipos⁸⁸.

No caso dos polimorfismos *Tth1111*, *ER22*, *23EK*, *N363S*, *BclII* e *9β*, a herança em haplótipos ocorre através do DL, já bem determinada na literatura. As variantes *BclII* e *N363S* estão associadas ao aumento da sensibilidade ao glicocorticoide, do risco cardiovascular e da obesidade visceral. As variantes *ER22*, *23EK*, *GR-9β* se correlacionam às medidas clínicas de sensibilidade diminuída e melhor perfil metabólico, principalmente quando associadas^{86,89-93}.

Localização e ação dos polimorfismos

Os polimorfismos mais comuns do gene do GR estão localizados tanto em áreas decodificadoras de proteínas, como nas intrônicas (**Figura 14**).

Figura 14 – Localização de polimorfismos do gene *NR3C1*. *Tth1111*: intron em área flangeadora 5'; *ER22, 23EK*: exon 2 (DNT); *N363S*: exon 2 (DNT); *BclI*: intron (entre exons 2 e 3); e *9β*: exon 9. DNT: domínio n-terminal de transativação; DLD: Domínio de ligação ao DNA; DLL: Domínio de ligação ao ligante (glicocorticoide).



Fonte: Adaptado⁹².

Polimorfismo *Tth1111*

O polimorfismo *Tth1111* consiste na troca do nucleotídeo C > T. A frequência do alelo menor T=0,2212 (Projeto 1000 Genomas). Foi localizado próximo à região promotora distal do gene e tem sido estudado em associação com outros polimorfismos, principalmente *ER22* e *23EK*, por causa da sua localização e dúvida quanto à ação sobre a sensibilidade ao glicocorticoide. Indivíduos portadores do alelo menor apresentaram, contudo, evidências de maior resistência ao glicocorticoide em teste de supressão do cortisol com baixa dose de dexametasona⁸⁹. Outros estudos clínicos apontaram para uma possível associação entre o alelo menor e fenótipos de resistência ao glicocorticoide⁹⁴, fatores de risco cardiovascular⁹⁵ e transtornos psiquiátricos^{96,97}.

Polimorfismos *ER22/23EK*

Os polimorfismos *ER22* e *23EK* são sempre descritos juntos, pois contemplam dois códons adjacentes (22 e 23) e estão em DL perfeito (D' e $r^2=1$). A frequência dos alelos menores na população é A=0,0106 (Projeto 1000 Genomas). Estudos *in vitro* confirmam que os polimorfismos se correlacionam à redução da capacidade de transativação, uma vez que estão localizados no domínio de transativação gênica. No entanto, mecanismos sobre a transrepressão também são descritos, sugerindo outras ações indiretas ainda não tão claras associadas ao polimorfismo. Há alteração na sequência do DNA que é de GAG/AGG para GAA/AAG, com tradução para ácido glutâmico/arginina (E-R) e para ácido-glutâmico/lisina (E-K). Estudos

moleculares apontam para um aumento em 15% da isoforma GR α -A com relação a GR α -B, na presença dos polimorfismos, o que parece estar associado ao aumento da resistência ao glicocorticoide⁹⁸.

Clinicamente, são descritos estudos de diferentes campos de atuação em que os polimorfismos parecem estar associados a melhores perfis de saúde metabólica e cardiovascular^{99,100}.

Polimorfismo N363S

A presença do polimorfismo *N363S*, esse também localizado no domínio de transativação do gene do GR, leva à troca do aminoácido asparagina (N) por serina (S), no códon 363 (AAT para AGT). A frequência do alelo menor é G=0,0062 (Projeto 1000 Genomas). Em pacientes com D-21OH, a presença do alelo menor foi associada a um melhor desfecho da doença, preveniu a virilização precoce de fetos femininos e modificou o padrão de obesidade¹⁰¹. Em indivíduos saudáveis, o polimorfismo foi associado a maior sensibilidade ao glicocorticoide, demonstrada por testes funcionais de supressão do cortisol com baixa dose de dexametasona. Em idosos, a variante foi também associada ao aumento do IMC e à diminuição de massa óssea^{102,103}. Estudos moleculares demonstraram modificações da proteína GR que regula diversos genes importantes, que atuam em processos como crescimento e manutenção celular e metabolismo de ácidos nucleicos¹⁰⁴.

Polimorfismo BclI

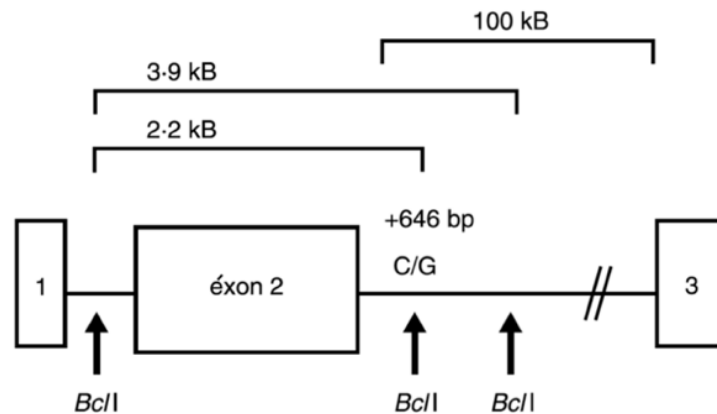
BclI é o polimorfismo do gene do GR mais frequente, G=0,2546 (Projeto 1000 Genomas) e, por isso, também o mais estudado. Sua localização é entre exons 2 e 3. Esse polimorfismo é um RFLP (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*), ou seja, um fragmento específico do DNA que é removido por uma enzima de restrição ou endonuclease¹⁰⁵.

Essa enzima de restrição reconhece os sítios que contenham a sequência T+ GATCA. Três sítios de *BclI* foram observados próximos ao exon 2¹⁰⁶ (**Figura 15**), mas apenas o polimorfismo localizado a 646 bp deste foi considerado polimórfico e correlacionado à sensibilidade ao glicocorticoide¹⁰⁷.

O alelo menor em homozigose (GG) está associado ao aumento da gordura corporal em adultos¹⁰⁸ e ao maior risco cardiovascular nos indivíduos com insuficiência adrenal de origem autoimune¹⁰⁹ e também com Hiperplasia Adrenal Congênita¹¹⁰. Diversos transtornos psiquiátricos na infância e adolescência¹¹¹⁻¹³ e a Depressão Maior no adulto¹¹⁴ são mais

frequentes entre indivíduos portadores do polimorfismo. Há também maior redução do cortisol sérico, quando portadores são submetidos aos testes de supressão com baixas doses de dexametasona (0,25 e 1 mg). Contudo, o mecanismo pelo qual o polimorfismo afeta a sensibilidade ao glicocorticoide ainda não está elucidado¹⁰⁷.

Figura 15 – Localização dos polimorfismos *BclI* do gene *NR3C1*, próximos ao éxon 2.



Fonte: Adaptado¹⁰⁷.

Polimorfismo 9β

O polimorfismo 9β (ou A3669G) contém uma alteração do nucleotídeo A > G na região 3'UTR não traduzida (do inglês, *untranslated region*, UTR). Essa região está localizada imediatamente após o sinal de término da região codificante e sinaliza com a sequência AUUUA, o fim da síntese proteica da isoforma β . A modificação está relacionada à desestabilização do RNA mensageiro e alteração dos níveis proteicos^{115,116}. Sua frequência é G=0,0839 (Projeto 1000 Genomas).

Crianças com D-21OH e portadoras do alelo menor têm um aumento do colesterol LDL, sem outras modificações importantes do risco cardiovascular que possam ser observadas ainda na infância⁹³. Por outro lado, indivíduos com Síndrome de Cushing possuem um efeito protetor, atenuando o efeito do hipercortisolismo endógeno e diminuindo o risco de diabetes e complicações cardiovasculares^{117,118}. Na população saudável, estudos apontam para um efeito protetor também com relação ao sistema imune¹¹⁹.

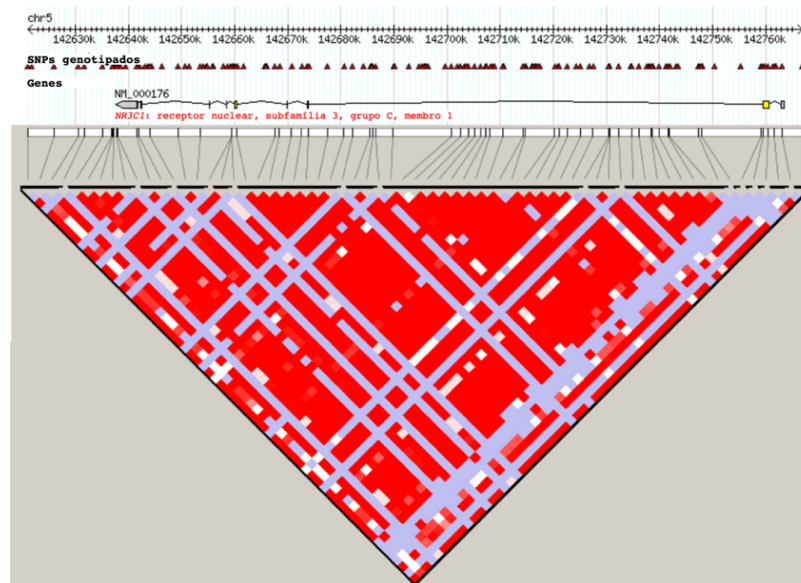
Recentemente, foi descrita uma outra variante do GR 9β , G3134T, com efeito similar ao polimorfismo 9β .¹²⁰

Haplótipos

Os polimorfismos citados do gene do GR estão organizados em haplótipos, sugerindo que possa haver um espectro da resposta ao glicocorticoide, dependendo das associações em questão (**Figura 16**)⁸⁶.

Há vários haplótipos descritos na literatura, dentre os mais comuns, estão o haplótipo *Wild* (do inglês: selvagem), (*BclII* + *Tth111I*) + (*BclII*), (*N363S*), (*Tth111I* + 9β), (*Tth111I* + *ER22/23EK* + 9β)^{91,92,111,121,122}.

Figura 16 – Desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos do gene *NR3C1*.



Fonte: Haploview, adaptado⁸⁶.

2.4 Avaliação Funcional da Sensibilidade ao Glicocorticoide

O uso dos glicocorticoides cresce continuamente como resultado do aumento da frequência de doenças crônicas e envelhecimento da população. Atualmente, os glicocorticoides são utilizados para tratamento de diversas patologias, além da forma clássica da D-21OH.

Há uma grande preocupação com o tratamento com glicocorticoides a longo prazo, mas a ideia de que os efeitos adversos são decorrentes exclusivamente do aumento dos seus níveis circulantes é controversa, e há um foco maior na atualidade no estudo da sensibilidade ao glicocorticoide como um fator altamente relevante para a resposta ao tratamento e os efeitos desse processo. Assim, diversos estudos funcionais têm sido realizados com o objetivo de avaliar a sensibilidade aos glicocorticoides¹²³.

Glicocorticoides sintéticos e o mecanismo de *feedback* no eixo hipotalâmico-hipofisário

Os glicocorticoides sintéticos, como a dexametasona, atuam principalmente através dos GRs, em contraste com o cortisol, que atua tanto nos GRs quanto nos MRs. Expressão de GR ocorre em todo o corpo e está envolvida na mediação de processos como glicogênese, metabolismo de gorduras e proteínas e função imune. MRs estão localizados nos rins, cólon, glândulas salivares e sudoríparas. No cérebro, os níveis de GR são particularmente altos no hipocampo, amígdala, núcleo paraventricular e córtex pré-frontal. MR é expresso principalmente em áreas límbicas, com altos níveis no hipocampo e níveis moderados na amígdala e no córtex pré-frontal. Por causa de suas diferentes afinidades e capacidades de ligação ao cortisol, o MR fica ocupado quando as concentrações de cortisol são baixas, como durante o nadir circadiano hormonal. GR só é ativado quando os níveis de cortisol são altos: no pico circadiano e em resposta ao estresse¹²⁴.

A dexametasona e outros glicocorticoides sintéticos, como a prednisolona, em doses baixas, penetram mal na barreira hematoencefálica devido à presença da glicoproteína P, que é um transportador. Portanto, baixas doses de dexametasona suprimem o eixo HHA, mas penetram mal no cérebro. Assim, criam um estado de adrenalectomia seletiva, na qual MRs e GRs centrais estão subativados. Doses mais altas de dexametasona fazem com que a capacidade de ligação da glicoproteína P seja ultrapassada, e assim a droga penetra no cérebro, ocupando GRs centrais, mas não MRs¹²⁵.

Os glicocorticoides sintéticos também são substratos para a 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipos 1 e 2, cujas concentrações variam conforme os tecidos, com conversão do glicocorticoide para formas inativas naqueles tecidos em que a aldosterona possui uma ação majoritária e precisa se ligar ao MR, como nos rins. Semelhante à interconversão entre cortisol e cortisona, prednisona e prednisolona sofrem interconversão pelo sistema enzimático. A hidrocortisona e prednisolona se ligam à CBG e albumina, enquanto a metilprednisolona e dexametasona se ligam apenas à albumina¹²⁶.

Os mecanismos de *feedback* são mediados pela ligação do cortisol aos GRs e MRs. Os GRs regulam a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (do inglês, *corticotropin-releasing hormone*, CRH) de maneira diferente, dependendo de sua localização no cérebro. A ligação do cortisol ao GR no hipotálamo regula uma alça negativa de *feedback* que inibe a secreção do CRH e ACTH. Outros dois mecanismos de *feedback* negativo são mediados pela ligação do cortisol aos GRs na hipófise e aos MRs no hipocampo. Os sistemas lentos de inibição do eixo são dependentes de ações genômicas. A inibição rápida em *feedback* negativo é não

genômica e deflagrada minutos após a administração de glicocorticoides sintéticos, com supressão de entradas sinápticas excitatórias glutamatérgicas e GABAérgicas para neurônios magnocelulares hipotalâmicos^{127,128}.

Testes de supressão com dexametasona

O teste de supressão com dexametasona oral, 1 mg, é amplamente utilizado para a triagem e no processo diagnóstico da Síndrome de Cushing. Contudo, doses inferiores a 1mg (0,25 e 0,5 mg)^{64,129} podem ser usadas para avaliação da sensibilidade ao glicocorticoide, na tentativa de se obter um espectro de resposta e não apenas supressão completa do eixo. Em pediatria, doses de dexametasona acima de 0,3 mg/m², contudo, podem suprimir completamente o eixo HHA¹³⁰ e, portanto, doses menores têm sido indicadas para avaliação quantitativa da sensibilidade ao glicocorticoide nessa faixa etária¹³¹. Testes com dose de 0,25 mg/m² foram realizados em adolescentes submetidos ao estresse e em crianças e adultos em tratamento com glicocorticoides sistêmicos. Nesses estudos, o nadir de cortisol sérico ocorreu entre 120 e 150 minutos após a infusão intravenosa de dexametasona¹³²⁻⁷.

REFERÊNCIAS

1. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev.* 2011;32(1):81-151.
2. Turcu AF, Auchus RJ. Adrenal steroidogenesis and congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2015;44(2):275-96.
3. Adrenal steroidogenesis [image on the Internet]. [cited 2020 Feb 2]; Available from: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Steroidogenesis.svg>
4. Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kurivama Y, et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* 1996;10(1):1-14.
5. Wang C, Pallan PS, Zhang W, Lei L, Yoshimoto FK, Waterman MR, et al. Functional analysis of human cytochrome P450 21A2 variants involved in congenital adrenal hyperplasia. *J Biol Chem.* 2017;292(26):10767-78.
6. White PC, Grossberger D, Onufer BJ, Chaplin DD, New MI, Dupont B, et al. Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82(4):1089-93.
7. White PC, New MI, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83(14):5111-5.
8. Haglund-Stengler B, martin Ritzén E, Gustafsson J, Luthman H. Haplotypes of the steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(19):8352-6.
9. Yang Z, Mendoza AR, Welch TR, Zipf WB, Yu CY. Modular variations of the human major histocompatibility complex class III genes for serine, threonine kinase RP, complement component C4, steroid 21-hydroxylase CYP21, and tenascin TNX (the RCCX module). A mechanism for gene deletions and disease associations. *J Biol Chem.* 1999;274(17):12147-56.
10. Gonçalves J, Friães A, Moura L. Congenital adrenal hyperplasia: focus on the molecular basis of the 21-hydroxylase deficiency. *Expert Rev Mol Med.* 2007;9(11):1-23.
11. Werkmeister JW, New MI, Dupont B, White PC. Frequent deletion and duplication steroid 21-hydroxylase genes. *M J Hum Genet.* 1986;39(4):461-9.
12. White PC. Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev.* 2000;21(3):245-91.
13. Tusié-Luna MT, White PC. Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase gene) and CYP21P involve different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(23):10796-800.

14. Falhammar H, Wedell A, Nordenström A. Biochemical and genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine* 2015;50(2):306-14.
15. Mendes C, Vaz de Matos I, Ribeiro L, Oliveira MJ, Cardoso H, Borges T. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: genotype-phenotype correlation. *Acta Med Port.*2015;28(1):56-62.
16. Zhang B, Lu L, Lu Z. Molecular diagnosis of Chinese patients with 21-hydroxylase deficiency and analysis of genotype-phenotype correlations. *J Int Med Res.* 2017;45(2):481-492.
17. Krone N, Arlt W. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23(2):181-92.
18. Pang S, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: newborn screening and its relationship to the diagnosis and treatment of the disorder. *Screening.* 1993;2(2-3): 105-139.
19. Falhammar H, Nordenström A. Nonclassic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: clinical presentation, diagnosis, treatment, and outcome. *Endocrine.* 2015;50(1):32-50.
20. Concolino P, Costella A. Congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency: a comprehensive focus on 233 pathogenic variants of CYP21A2 gene. *Mol Diagn Ther.* 2018;22(3):261-280.
21. Nermoen I, Husebye ES, Myhre AG, Løvås K. Classical congenital adrenal hyperplasia. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2017;137(7): 540-543.
22. Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, Baskin IS, Conway GS, Merke DP, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: An Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(11):4043-88.
23. Barra CB, Silva IN, Pezzuti IL, Januário JN. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Rev Assoc Med Bras.* 1992;58(4):459-64.
24. Kurtoğlu S, Hatipoğlu N. Non-classic congenital adrenal hyperplasia in childhood. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2017;9(1):1-7.
25. Becker, DE. Basic and clinical pharmacology of glucocorticoids. *Anest Prog.* 2013;60(1):25-31.
26. Stikkelbroeck NM, Van't Hof-Grootenboer BA, Hermus AR, Otten BJ, Van't Hof MA. Growth inhibition by glucocorticoid treatment in salt-wasting 21-hydroxylase deficiency: in early infancy and pre (puberty). *J Clin Endocrinol Metab.*88(8):3525-30.

27. Thilén A, Woods KA, Perry LA, Savage MO, Wedell A, Ritzén EM. Early growth is not increased in untreated moderately severe 21-hydroxylase deficiency. *Acta Paediatr.* 1995;84(8):894-8.
28. Hindmarsh PC. Management of the child with congenital adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23(2):193-208.
29. Charmandari E, Brook CG, Hindmarsh PC. Why is management of patients with classical congenital adrenal hyperplasia more difficult at puberty? *Arch Dis Child.* 2002;86(4):266-9.
30. Charmandari E, Brook CG, Hindmarsh PC. Classic congenital adrenal hyperplasia and puberty. *Eur J Endocrinol* 2004;151(3): U77-82.
31. Bonfig W, Schawarz HP. Growth pattern of untreated boys with simple virilizing congenital adrenal hyperplasia indicates relative androgen insensitivity during the first six months of life. *Horm Res Paediatr.* 2011;75(4):264-8.
32. Dayal D, Aggarwal A, Seetharaman K, Muthuvel B. Central precocious puberty complicating congenital adrenal hyperplasia: north Indian experience. *Indian J Endocrinol Metab.* 2018;22(6):858-859.
33. Maheshwari A, Khadilkar V, Gangodkar P, Khadilkar A. Long-term growth in congenital adrenal hyperplasia. *Indian J Pediatr.* 2019;86(2):154-158.
34. Juan L, Huamei M, Zhe S, Yanhong L, Hongshan C, Oiuli C, et al. Near-final height in 82 patients with congenital adrenal hyperplasia due to classic 21-hydroxylase deficiency: a single-center study of China. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2016;29(7):841-8.
35. Güven A, Nircam Cebeci A, Hancili S. Gonadotropin releasing hormone analog treatment in children with congenital adrenal hyperplasia complicated by central precocious puberty. *Hormones (Athens).* 2015;14(2):265-71.
36. Eckoldt-Wolke F. Timing of surgery for feminizing genitoplasty in patients suffering from congenital adrenal hyperplasia. *Endocr Dev.* 2014; 27:203-9.
37. Pijnenburg-Kleizen KJ, Thomas CMG, Otten BJ, Roeleveld N, Claahsen-van der Grinten HL. Long-term follow-up of children with classical adrenal hyperplasia: suggestions for age dependent treatment in childhood and puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2019;32(10):1055-63.
38. Charmandari E, Hindmarsh PC, Johnston A, Brook CG. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: alterations in cortisol pharmacokinetics at puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(6):2701-8.

39. Bonfig W. Growth and development in children with classical congenital adrenal hyperplasia. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.*2017;24(1):39-42.
40. Bonfig W, Pozza SB, Schimidt H, Pagel P, Knorr D, Schawarz HP. Hydrocortisone dosing during puberty in patients with classical congenital adrenal hyperplasia: an evidence-based recommendation. *J Clin Endocrinol Metab.*2009;94(10):3888-8.
41. Ozisik H, Yurekli BS, Simsir IY, Altun I, Soyaltin U, Guler E, et al. Testicular adrenal rest tumor (TART) in congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Med Genet.* 2017; 60(9):489-493.
42. Eugster EA, Dimeglio LA, Wright JC, Freidenberg GR, Seshadri R, Pescovitz OH. Height outcome in congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency: a meta-analysis. *J Pediatr.*2001;138(1):26-32.
43. Bonfig W, Bechtold S, Schmidt H, Knorr D, Schawarz HP. Reduced final height outcome in congenital adrenal hyperplasia under prednisone treatment: deceleration of growth velocity during puberty. *J Clin Endocrinol Metab.*2007;92(5):1635-9.
44. Gosetti, Mazzucco E, Gennaro MC, Marengo E. Ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination and profiling of prohibited steroids in human biological matrices. A review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*2013; 927:22-36.
45. Debono M, Price JN, Ross RJ. Novel strategies for hydrocortisone replacement. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*2009;23(2):221-32.
46. Simon N, Castinetti F, Ouliac F, Lesavre N, Brue T, Oliver C. Pharmacokinetic evidence for suboptimal treatment of adrenal insufficiency with currently available hydrocortisone tablets. *Clin Pharmacokinet.*2010;49(7):455-63.
47. Derendorf H, Mollmann H, Barth J, Mollmann C, Tunn S, Krieg M. Pharmacokinetics and oral bioavailability of hydrocortisone. *J Clin Pharmacol.* 1991;31(5):473-6.
48. Mah PM, Jenkins RC, Rostami-Hodjegan A, Newell-Price J, Doane A, Ibbotson V, et al. Weight-related dosing, timing and monitoring hydrocortisone replacement therapy in patients with adrenal insufficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;61(3):367-75.
49. Patel RB, Rogge MC, Selen A, Goehl TJ, Shah VP, Prasad VK, et al. Bioavailability of hydrocortisone from commercial 20 mg tablets. *J Pharm Sci.* 1984;73(7):964-6.
50. Barbhaiva RH, Welling PG. Influence of food on the absorption of hydrocortisone from the gastrointestinal tract. *Drug Nutr Interact.* 1982;1(2):103-12.

51. Johnson TN, Whitaker MJ, Keevil B, Ross RJ. Bioavailability of oral hydrocortisone corrected for binding proteins and measured by LC-MS/MS using serum cortisol and salivary cortisone. *J Bioequiv Availab*.2018;10(1):001-3.
52. Werumeus Buning J, Touw DJ, Brummelman P, Dullaart RPF, van den Berg G, van der Klauw MM, et al. Pharmacokinetics of oral hydrocortisone: results and implications from a randomized controlled trial. *Metabolism*.2017;71:7-16.
53. Porter J, With M, Ross RJ. Immediate-release granule formulation of hydrocortisone, Alkindi®, for treatment of paediatric adrenal insufficiency (Infacort development programme). *Expert Rev Endocrinol Metab*.2018;13(3):119-24.
54. Merza Z, Rostami-Hodjegan A, Memmott A, Doane A, Ibbotson V, Newell-Price J, et al. Circadian hydrocortisone infusions in patients with adrenal insufficiency and congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*.2006;65(1):45-50.
55. Newell-Price J, Whiteman N, Rostami-Hodjegan A, Darzy K, Shalet S, Tucker GT, et al. Modified-release hydrocortisone for circadian therapy: a proof of principle study in dexamethasone suppressed normal volunteers. *Clin Endocrinol (Oxf)*.2008;68(1):130-5.
56. Jones CM, Mallappa A, Reisch N, Nikolaou N, Krone N, Hughes BA, et al. Modified release and conventional glucocorticoids and diurnal androgen excretion in congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*.2017;102(6):1797-1806.
57. Mcknee S. Diurnal shares plummet on trial failure. *PharmaTimes* online. 2018 Oct 09 [cited 2020 Feb 2] Available from: http://www.pharmatimes.com/news/diurnal_shares_plummet_on_trial_failure_1255142
58. Loechner KJ, McLaughlin JT, Calikoglu AS. Alternative strategies for treatment of classical congenital adrenal hyperplasia: pitfalls and promises. *Int J Pediatr Endocrinol* 2010;670960.
59. Han TS, Stimson RH, Rees DA, Krone N, Willis DS, Conway GS, et al. United Kingdom Congenital Adrenal Hyperplasia Adult Study Executive (CaHASE). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;78(2):197-203.
60. Cordeiro GV, Silva IN, Goulart EM, Chagas AJ, Kater CE. Final height in congenital adrenal hyperplasia: the dilemma of hypercortisolism versus hyperandrogenism. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2013;57(2):126-31.
61. Chapman K, Holmes M, Seckl J. 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase: intracelular gatekeepers of tissue glucocorticoid action. *Physiol Rev*;93(3):1139-206.
62. Barnes PJ, Adcock IM, Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet*.2009;373(9678):1905:17.

63. Saka N, Güven M, Bas F, Darendeliler F, Bundak R, Günöz H, et al. Glucocorticoid receptors in patients with congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Endocrinol Metab.*2000;13(8):1101-7.
64. Huizenga NA, Koper JW, de Lange P, Pols HA, Stolk RP, Grobbee DE, et al. Interperson variability but intraperson stability of baseline plasma cortisol concentrations, and its relation to feedback sensitivity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to a low dose of dexamethasone in elderly individuals. *J Clin Endocrinol Metab.*1998;83(1):47-54.
65. Nicolaides NC, Charmandari E. Glucocorticoid resistance. *Expl Suppl.*2019;111: 85-102.
66. van Rossum EF, van den Akker EL. Glucocorticoid resistance. *Endocr Dev.*2011; 20:127-36.
67. Nebesio TD, Renbarger JL, Nabhan ZM, Ross SE, Slaven JE, Li L, et al. Differential effects of hydrocortisone, prednisone, and dexamethasone on hormonal and pharmacokinetic profiles: a pilot study in children with congenital adrenal hyperplasia. *Int J Pediatr Endocrinol.*2016;2016:17.
68. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, et al. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature.* 1985;318(6047):635-41.
69. Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB, Delves CJ, Apolito CJ, McKee DD, et al. Crystal structure of the glucocorticoid ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell.* 2002;110(1):93-105.
70. Carballo-Jane E, Pandit S, Santaro JC, Freund C, Luell S, Harris G, et al. Skeletal muscle: a dual system to measure glucocorticoid-dependent transactivation and transrepression gene regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;88(2):191-201.
71. The *NR3C1* gene promoter region (Thomas D. Siamatras, Constantine A. Stratakis) [image on the Internet]. 2015; cited 2020 Feb 2]. Available from: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/NR3C1ID45665ch5q31.html>
72. Palma-Gudiel H, Córdova-Palomera A, Leza JC, Fñanás L. Glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) methylation processes as mediators of early adversity in stress-related disorders causality: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev.*2015; 55:520:35.
73. Penek M, Pietras T, Fabijan A, Milanowski M, Wieteska L, Górski P, et al. Effect of glucocorticoid receptor gene polymorphism on asthma phenotypes. *Exp Ther Med.* 2013;5(2):572-80.
74. Faria CD, Longui CA. Molecular aspects of glucocorticoid sensitivity. *Article in Portuguese.* *Arq Bras Endocrinol Metabol.*2006;50(6):983-95.

75. Goleva E, Li LB, Eves PT, Strand ML, Martin RJ, Leung DY. Increased Glucocorticoid receptor in glucocorticoid-insensitive asthma. *AM J Respir Crit Care Med.* 2006;173(6):607-16.
76. Pedersen KB, Geng CD, Vedeckis WV. Three mechanisms are involved in glucocorticoid receptor autoregulation in a human T-lymphoblast cell line. *Biochemistry.* 2004;3143(34):10851-8.
77. Leventhal SM, Lim D, Green TL, Cantrell AE, Cho K, Greenhalgh DG. Uncovering a multitude of human glucocorticoid receptor variants: an expansive survey of a single gene. *BMC Genet.*2019;20(1):16.
78. Oakley RH, Cidlowski JA. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem.* 2011 Feb;286(5):3177-84.
79. Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Corticosteroids: mechanisms of action in health and disease. *Rheum Dis Clin North Am.* 2016;42(1):15-31.
80. Khan SH, McLaughlin WA, Kumar R. Site-specific phosphorylation regulates the structure and function of an intrinsically disordered domain of the glucocorticoid receptor. *Sci Rep.* 2017;7(1):15440.
81. Antunica-Noguerol M, Budziński ML, Druker J, Gassen NC, Sokn MC, Senin S, et al. The activity of the glucocorticoid receptor is regulated by SUMO conjugation to FKBP51. *Cell Death Differ.*2016;23(10):1579-91.
82. Kino T, Chrousos GP. Acetylation-mediated epigenetic regulation of glucocorticoid receptor activity: circadian rhythm-associated alterations of glucocorticoid actions in target tissues. *Mol Cell Endocrinol* 2011;336(1-2):23-30.
83. Vitellius G, Trabado S, Bouligand J, Delemer B, Lombès M. Pathophysiology of glucocorticoid signaling. *Ann Endocrinol (Paris).* 2108;79(3):98-106.
84. Nicolaides NC, Chrousos GP. Bilateral adrenal hyperplasia and NR3C1 mutations causing glucocorticoid resistance: is there an association? *Eur J Endocrinol.*2018;179(5):C1-C4.
85. Kino T. Single Nucleotide Variations of the human GR gene manifested as pathologic mutations or polymorphisms. *Endocrinology.*2018;159(7):2506-2519.
86. Koper JW, van Rossum EF, van den Akker EL. Glucocorticoid receptor polymorphism and haplotypes and their expression in health and disease. *Steroids.*2014;92:62-73.
87. Bray, PJ. Cotton RG. Variations of the human glucocorticoid receptor gene (NR3C1): pathological and in vitro mutations and polymorphisms. *Hum Mutat.*2003;21(6):557-68.

88. Panoutsopoulou K, Wheeler E. Key concepts in genetic epidemiology. *Methods Mol Biol.* 2018; 1793:7-24.
89. van Rossum EF, Roks PH, de Jong FH, Brinkmann AO, Pols HA, Koper JW, et al. Characterization of a promoter polymorphism in the glucocorticoid receptor gene and its relationship to three other polymorphisms. *Clin Endocrinol (Oxf).*2004;61(5):573-81.
90. Schote AB, Bonenberger M, Pálmason H, Seitz C, Meyer J, Freitag CM. Glucocorticoid receptor variants in childhood attention-deficit-hyperactivity disorder and comorbid psychiatric disorders. *Psychiatry Res.*2016; 246:275-283.
91. Dekker MJ, Van den Akker EL, Koper JW, Manenschiin L, Geleiiins K, Ruts L, et al. Effect of glucocorticoid receptor gene polymorphisms in Guillain-Barré Syndrome. *J Peripher Nery Syst.*2009;14(2):75-83.
92. Melief J, Koper JW, Endert E, Møller HJ, Hamann J, Uidehaag BM, et al. Glucocorticoid receptor haplotypes conferring increased sensitivity (*BcII* and *N363S*) are associated with faster progression of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.*2016;299:84-89.
93. Moreira RP, Gomes LG, Madureira G, Mendonça BB, Bachega TA. Influence of the *A3669G* glucocorticoid receptor gene polymorphism on the metabolic profile of pediatric patients with congenital adrenal hyperplasia. *Int J Endocrinol.*2014;594710.
94. Panek M, Pietras T, Fabijan A, Miłanowski M, Wieteska L, Górski P, et al. Effect of glucocorticoid receptor gene polymorphisms on asthma phenotypes. *Exp Ther Med.* 2013;5(2):572-80.
95. Yan YX, Dong J, Wu LJ, Shao S, Zhang J, Zhand L, et al. Associations between polymorphisms in the glucocorticoid-receptor gene and cardiovascular risk factors in a Chinese population. *J Epidemiol.* 2013;23(5):389-95.
96. Shatzberg AF, Keller J, Tennakoon L, Lembke A, Williams G, Kraemer FB, et al. HPA axis genetic variation, cortisol and psychosis in major depression. *Mol Psychiatry.*2014;19(2):220-7.
97. Schote AB, Jäger K, Kroll SL, Vonmoos M, Hulka LM, Meyer J, et al. Glucocorticoid receptor gene variants and lower expression of *NR3C1* are associated with cocaine use. *Addict Biol.* 2019;24(4):730-42.
98. Russcher H, van Rossum EF, de Jong FH, Brinkmann AO, Lamberts SW, Koper JW. Increased expression of the glucocorticoid receptor-A translational isoform as a result of the *ER22/23EK* polymorphism. *Mol Endocrinol.* 2005;19(7):1687-96.

99. Kuningas M, Mooijaart SP, Slagboom PE, Wetendorp RG, van Heemst D. Genetic variants in the glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) and cardiovascular disease risk. The Leiden 85-plus Study. *Biogerontology*.2006;7(4):231-8.
100. van Rossum EF, Koper JW, Huizenga NA, Uitterlinden AG, Janssen JA, Brinkmann AO, et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes*.2002;51(10):3128-34.
101. Luczay A, Török D, Ferenczi A, Majnik J, Sólvom J, Fekete G. Potential advantage of *N363S* glucocorticoid receptor polymorphism in 21-hydroxylase deficiency. *Eur J Endocrinol*.2006;154(6):859-64.
102. Russcher H, Smit P, van den Akker EL, van Rossum EF, Brinkmann AO, de Jong FH, et al. Two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene directly affect glucocorticoid-regulated gene expression. *J Clin Endocrinol Metab*.2005;90(10):5804-10.
103. Huizenga NA, Koper JW, De Lange P, Pols HA, Stolk RP, Burger H, et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*.1998;83(1):144-51.
104. Jewell CM, Cidlowski JA. Molecular evidence for a link between the *N363S* glucocorticoid receptor polymorphism and altered gene expression. *J Clin Endocrinol Metab*.2007;92(8):3268-77.
105. Williams RC. Restriction fragment length polymorphism (RFLP). *AM L Phys Anthropol*. 1989;32(s10):159-184.
106. Murray JC, Smith RF, Ardinger HA, Weinberger C. RFLP for the glucocorticoid receptor (GRL) located at 5q11-5q13. *Nuclei Acids Res*.1987;15(16):6765.
107. van Rossum EF, Koper JW, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Arp P, Ester W, et al. Identification of the *BcII* polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index. *Clin Endocrinol (Oxf)*.2003;59(5):585-92.
108. Geelen CC, van Greevenbroek MM, van Rossum EF, Schaper NC, Nijpels G, et al. *BcII* glucocorticoid receptor polymorphism is associated with greater body fatness: the Hoorn and CODAM studies. *Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(3): E595-9.
109. Giordano R, Marzotti S, Berardelli R, Karamouzis I, Brozzetti A, D'Angelo V, et al. *BcII* polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with increased obesity, impaired glucose metabolism and dyslipidemia in patients with Addison's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*.2012;77(6):863-70.

110. Moreira RP, Gomes LG, Mendonca BB, Bachega TA. Impact of glucocorticoid receptor gene polymorphism on the metabolic profile of adult patients with the classical form of 21-hydroxylase deficiency. *PLoS One*. 2012;7(9): e44893.
111. Schote AB, Bonenberger M, Pálmason H, Seitz C, Meyer J, Freitag CM. Glucocorticoid receptor variants in childhood attention-deficit/hyperactivity disorder and comorbid psychiatric disorders. *Psychiatry Res*. 2016; 30246:275-283.
112. Dmitrzak-Weglarz M, Szczepankiewicz A, Slopian A, Tyszkiewicz M, Maciukiewicz M, Zaremba D. Association of the glucocorticoid receptor gene polymorphism and their interaction with stressful life events in Polish adolescent girls with anorexia nervosa. *Psychiatr Danub*.2016;28(1):51-7.
113. Castellini G, Lelli L, Tedde A, Piaceri I, Bagnoli S, Lucenteforte E, et al. Analyses of the role of the glucocorticoid receptor gene polymorphism (rs41423247) as a potential moderator in the association between childhood overweight, psychopathology, and clinical outcomes in Eating Disorders patients: 6 years follow up study. *Psychiatry Res*. 2016; 243:156-60.
114. Peng Q, Yan H, Wen Y, Lai C, Shi L. Association between *NR3C1* rs41423247 polymorphism and depression: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*.2018;97(39): e12541.
115. Oakley RH, Jewell CM, Yudit MR, Bofetiado DM, Cidlowski JA. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanism of action. *J Biol Chem*.1999;274(39):27857-66.
116. Schaaf MJ, Cidlowski JA. AUUUA motifs in the 3'UTR of human glucocorticoid receptor alpha and beta mRNA destabilize mRNA and decrease receptor protein expression. *Steroids* 2002;67(7):627-36.
117. Roerink SH, Wagenmakers MA, Smit JW, van Rossum EF, Netea-Maier RT, Plantinga TS, et al. Glucocorticoid receptor polymorphism modulate cardiometabolic risk factors in patients in long-term remission of Cushing's syndrome. *Endocrine*.2016;53(1):63-70.
118. Trementino L, Appolloni G, Concettoni C, Cardinaletti M, Boscaro M, Arnaldi G. Association of glucocorticoid receptor polymorphism *A3669G* with decreased risk of developing diabetes in patients with Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol*.2012;166(1):35-42.
119. Van den Akker EL, Russcher H, van Rossum EF, Brinkmann AO, de Jong FH, Hokken A, et al. Glucocorticoid receptor polymorphism affects transrepression but not transactivation. *J Clin Endocrinol Metab*.2006;91(7):2800-3.

120. Kaya Z, Caglayan S, Akkiprik M, Aral C, Ozisik G, Ozata M, et al. Impact of glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) polymorphisms in Turkish patients with metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest.*2016;39(5):557-66.
121. Koejvoets KC, van der Net JB, van Rossum EF, Steverberg EW, Defesche JC, Kastlein JJ, et al. Two common haplotypes of the glucocorticoid receptor gene are associated with increased susceptibility to cardiovascular disease in men with familial hypercholesterolemia. *J Clin Endocrinol Metab.*2008;93(12):4902-8.
122. Whirledge SD, Jewell CM, Barber LM, Xu X, Katzen KS, Garantziotis S, et al. Generating diversity in human glucocorticoid signaling through a racially diverse polymorphism in the beta isoform of the glucocorticoid receptor. *Lab Invest.*2017;97(11):1282-1295.
123. Rodriguez JM, Alvarez MM, Henriquez S, Llanos MN, Troncoso R. Glucocorticoid resistance in chronic diseases. *Steroids.* 2016;115:182-192.
124. Gjerstad JK, Lightman SL, Spiga F. Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA-axis pulsatility. *Stress.*2018;21(5):403-416.
125. Meijer OC, de Kloet ER. A refill for the brain mineralocorticoid receptor: the benefit of cortisol add-on to dexamethasone therapy. *Endocrinology.*2017;158(3):448-54.
126. Scherholz ML, Schlesinger N, Androulakis IP. Chronopharmacology of glucocorticoids. *Adv Drug Deliv Rev.*2019;151-152.
127. Uchoa ET, Aguilera G, Herman JP, Fiedler JL, Deak T, Sousa MBC. Novel aspects of hypothalamic-adrenal axis regulation and glucocorticoid actions. *J Neuroendocrinol.* 2014;26(9):557-72.
128. Di S, Maxson MM, Franco A, Tasker JG. Glucocorticoids regulate glutamate and GABA synapse-specific retrograde transmission via divergent nongenomic signaling pathways. *J Neurosci.*2009;29(2):393-401.
129. Direk N, Dekker ML, Luik AI, Kirschbaum C, de Rijke YB, Hofman A, et al. The very low-dose dexamethasone suppression test in the general population: a cross-sectional study.
130. Hindmarsh PC, Brook CG. Single dose dexamethasone tests in children: dose relationships to body size. *Clin Endocrinol (Oxf).*1985;23(1):67-70.
131. Stevens A, Ray DW, Zeggini E, John S, Richards HL, Griffiths CE, et al. Glucocorticoid sensitivity is determined by a specific glucocorticoid haplotype. *J Clin Endocrinol Metab.*2004;89(2):892-7.

132. Faria CD, Cobra JF, Silva TS, Melo MR, Rocha MN, Longui CA, et al. A very low dose intravenous dexamethasone suppression test as an index of glucocorticoid sensitivity. *Horm Res.* 2008;69(6):357-362.
133. Silva TS, Longui CA, Faria CD, Rocha MN, Melo MR, Faria TG, et al. Impact of prolonged physical training on the pituitary glucocorticoid sensitivity determined by very low dose intravenous dexamethasone suppression test. *Horm Metab Res.* 2008;40(10):718-721.
134. Cobra JF, Melo MR, Faria CD, Longui CA, Monte O. Simultaneous evaluation of *in vivo* glucocorticoid sensitivity and expression of glucocorticoid receptor alpha-isoform in rheumatoid arthritis patients. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009;53(1):24-30.
135. Faria CD, Castro RB, Longui CA, Kochi C, Barbosa VL, Silva TS, et al. Impact of prolonged low-grade physical training on the *in vivo* glucocorticoid receptor sensitivity and on glucocorticoid receptor- α mRNA levels of obese adolescents. *Horm Res Paediatr.* 2010;73(6):458-464.
136. Cavalcante LO, Melo MR, Dinis VG, Castro RB, Souza BD, Longui CA. Quantitation of glucocorticoid receptor alpha and NF- κ B pathway mRNA and its correlation with disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Genet Mol Res.* 2010;9(4):2300-2310.
137. Melo AK, Melo MR, Saramago AB, Demartino G, Souza BD, Longui CA. Persistent glucocorticoid resistance in systemic lupus erythematosus patients during clinical remission. *Genet Mol Res.* 2013;12(2):2010-2019.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a sensibilidade ao glicocorticoide e sua correlação com polimorfismos do gene do receptor glicocorticoide (*NR3C1*) em indivíduos com a forma clássica da deficiência da 21-hidroxilase.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar a frequência de seis polimorfismos (*Tth111I*, *ER22*, *23EK*, *N363S*, *BcII*, *9β*) do gene do receptor glicocorticoide (*NR3C1*) em indivíduos com a forma clássica da deficiência da 21-hidroxilase (população de interesse) e em um grupo-controle constituído por indivíduos saudáveis;
2. Determinar os haplótipos correlacionados aos polimorfismos na população de interesse e grupo-controle;
3. Estimar os genótipos na população de interesse;
4. Correlacionar o genótipo com o fenótipo na população de interesse.

4 MÉTODOS

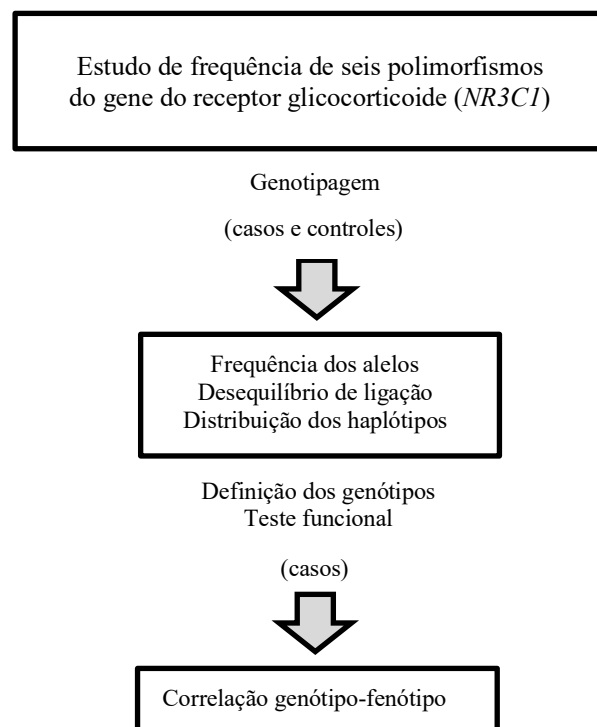
4.1 Ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG (Plataforma Brasil, parecer número 1.172.019 – **Anexo A**), com anuência do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Saúde da Criança e do Adolescente) da Faculdade de Medicina da UFMG, da Câmara do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG, das diretorias das instituições envolvidas (Faculdade de Medicina e Hospital das Clínicas da UFMG) e do Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da UFMG. Após devidamente esclarecidos, crianças, adolescentes e adultos participantes, bem como pais ou responsáveis, quando pertinente, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo B**).

4.2 Fluxograma do estudo

Trata-se de um estudo da frequência de seis polimorfismos do gene do GR (*NR3C1*)^{1,2} e de seus arranjos em haplótipos, numa abordagem do tipo caso-controle, usando indivíduos não relacionados e com posterior associação fenotípica entre os casos. O fluxograma do estudo está esquematizado a seguir (**Figura 17**).

Figura 17 – Fluxograma do estudo.



Fonte: elaborado pela autora.

4.3 Estudo da frequência dos polimorfismos e haplótipos

Casuística

A população de interesse foi composta por 102 indivíduos com a forma clássica da D-21OH, com idade mediana de 8 anos – intervalo interquartil (IIQ) de 2-17 anos; 29 (28,4%) do sexo masculino, e 73 (71,6%) do sexo feminino. Foram recrutados no primeiro semestre de 2016, nos ambulatórios de endocrinologia pediátrica e de adultos do Hospital das Clínicas (HC-UFG). O diagnóstico da D-21OH foi baseado na avaliação clínica e bioquímica; 26 (25%) dos pacientes foram diagnosticados no contexto do Programa de Triagem Neonatal para D-21OH. Estavam sob acompanhamento no serviço, com consultas clínicas e realização de exames laboratoriais periodicamente (3-6 meses), em uso regular de glicocorticoide, 102 (100%), e também de mineralocorticoide, 95 (93%), quando indicado, de acordo com o protocolo assistencial.

O grupo-controle foi constituído por 163 indivíduos saudáveis, sem nenhuma doença crônica ou tomando qualquer medicamento regularmente; com idade mediana de 31– IIQ 27-41 anos; 58 (35,6%) do sexo masculino e 105 (64,4%) do sexo feminino; provenientes da mesma área geográfica (Estado de Minas Gerais). Foram recrutados no Centro de Atenção Primária do Hospital das Clínicas (HC-UFG), no período de 2010-2013.

Genotipagem

A genotipagem foi realizada em 102 casos e 163 controles. Foram coletados 5mL de sangue periférico de cada participante, em tubos contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético), no Serviço de Medicina Laboratorial do HC-UFG, segundo os procedimentos habituais. As amostras foram processadas no laboratório de pesquisa de referência (Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, da Faculdade de Medicina da UFG).

O ácido desoxirribonucleico (DNA) de cada amostra foi extraído da camada leucoplaquetária de células mononucleares do sangue periférico, de acordo com técnicas padrão (<https://www.qiagen.com/us>). Após o isolamento do DNA, sua concentração foi medida pelo espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare). A solução foi diluída para uma concentração final de aproximadamente 50 ng/μL para ser processada.

Os polimorfismos do gene *NR3C1* (*Tth111I*, *ER22*, *23EK*, *N363S* e *GR-9β*) foram genotipados através dos ensaios desenhados pela TaqMan® (Identidade dos SNPs: rs10052957, rs6189, rs6190, rs56149945, rs6198), que utilizam tecnologia de discriminação alélica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) (Applied Biosystems, Foster City, CA,

EUA); foi utilizado o Master Mix da TaqMan™ Universal PCR (Applied Biosystems) e 50 ng de DNA para as reações. O dispositivo de PCR em tempo real utilizado foi o Sistema QuantStudio 3 (Applied Biosystems) que contempla 96 poços; o software de design e análise foi o QuantStudio™ v1.4.1. As reações foram realizadas de acordo com o protocolo padrão: 95°C por 10 minutos, 50 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto.

A determinação do polimorfismo *BclI* (rs41423247) foi realizada por reação em cadeia da polimerase, a partir de fragmentos de DNA obtidos por uma enzima de restrição (do inglês, *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*, PCR-RFLP), conforme uma técnica adaptada de um estudo previamente publicado.³ A amplificação do fragmento do gene *NR3C1* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde, numa reação com volume final de 10 µL contendo tampão para PCR 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo (direto: 5'-AGAGCCCTATTCTTCAAACCTG-3' e reverso: 5'-GAGAAATTCACCCCTACCAAC-3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A reação de amplificação foi feita em termociclador (Mastercycler® Nexus Thermal Cycler, Eppendorf) com uma fase inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95°C por 60 segundos, 56°C por 60 segundos e 72°C por 90 segundos, mais uma fase de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (418 pb) foi digerido com a enzima de restrição (Time-Saver™ *BclI*, New England BioLabs Inc.) à temperatura de 50°C, durante 15 minutos em banho seco (Standard Heatblock, VWR Scientific), numa reação de volume final de 15 µL (5 µL do produto da amplificação, 2 µL de tampão NEBuffer 3.1 1X, 1 µL da enzima *BclI* [10U] e 7 µL de água tipo I). Após o período de clivagem, a reação foi submetida a 60°C durante 20 minutos para inativação.

Para visualização dos produtos da restrição, 15 µL do produto da RFLP, adicionados de 1 µL do tampão de migração xileno cianol 5X, foram aplicados em gel de agarose 2%, contendo SYBR Safe. A migração em eletroforese foi realizada à 80 volts, durante 30 minutos, em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado em transiluminador (K33-312A, KASVI), sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados.

Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 100 pb (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas). Essa enzima *BclI* reconheceu e clivou o sítio de restrição 5'...T↓GATCA...'.³ Dessa forma, o fragmento contendo o alelo selvagem C em homozigose clivado, gerou fragmentos de 267 pb e 151 pb. O fragmento de 418 pb contendo o alelo mutante G em homozigose não apresentou sítio de restrição, permanecendo do mesmo

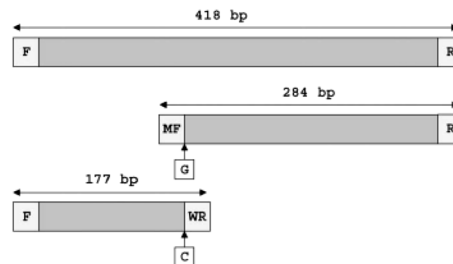
tamanho após a clivagem. O genótipo heterozigoto foi identificado na presença de três fragmentos (418 pb, 267 pb e 151 pb) (**Figura 18**).

Figura 18 – Genotipagem do polimorfismo *Bcl*I: A figura superior mostra, em letras maiúsculas, o fragmento correspondente ao final do exon 2 do gene do receptor do glicocorticoide. O polimorfismo consiste na substituição de C por G, 646 pares de bases a partir do exon 2 (sublinhado duplo). As sequências sublinhadas indicam a localização dos *primers* usados no ensaio. A figura inferior mostra a posição dos *primers* de oligonucleotídeos e os produtos amplificados (F: Direto, R: Reverso, MF: Mutante, WR: selvagem). As setas horizontais indicam o tamanho dos produtos amplificados. As posições dos alelos selvagem (C) e mutante (G) estão indicadas por setas verticais.

```

TGGCTATTCA AGGTAAGATC AGTGTTTTTC TGTTCCTTAA GAATGGTACA TTTAAGGTAG ATTAATAGAT GTAATCTTC
ATTGATTTAT ATGTGTTCTC TAAAGATTCA TGTGCTTTTT TATATGAATA AGTTTAAGTG GCCTTTTGAA AGTAGGAAG
GTAGACAACC TAAGTGACAT CTGTACGTAA CCAITTCAGG TTTTTCCTT AAATAGTGGT TTTCAGTATC CCAITGGCCA
ACGGTGAGGA TTTTATTTAA CATTTTAA AAATATGTTGC TCATTAACAG ATATCTTAAAC GAAAAATTAT ATAAATTCAG
GAGAGTATAA TGTCTCATAA TATCATATTG TGTGTGCAT GGTCAITTCAG CTGTTTAGA ATATGTTCTT ATATTACAAT
AAATGATACC CTTACTTACA TAGTCAAAG TGTGCTGCC TTATTTGTAA ATTCGTTAAG TGTAGCTTG AGAITAAAGA
GTTAAAGCA GAAGTACTAA CAAGAGGCC TATTCCTTCA ACTGAATCTT CTGTTAAGA ATTTGAGTTT TGAAGTTGCT
AAAGCAATGC AGTGAACAGT GTACCAGACC ATAGTATTAG ACACAGGTCT TGCTCACAGG GTTCTTGCCA TAAAGTAGC
AAGTTATGTC TGCTGATCBA TCTCTTTAAG AGAGGAATTG GTGTCAACAT GGTGCAAAAC AAAATTTTAC GTTCAAATGT
TCGTGCAAGT TCTCAAGTAG ATAACGTATG GCCAAAATTG TTAAGCTTCA ATTTTCAGCT TTCGTTTGTAT TTTTCTCTTT
TTTTTACTCA GTCGTTTATA AGCATACTGA TATTTTGTG TGACCCAAA AGGTGAGAAA ATGGAATTAT CAGAAAAAAG
TTCTAAATGT AGATATAAGT GTTGGTAGGG GTGAATTTCT CTACCCCGTA ACCTCATCC CAATTCAGAT AAATGCTAGG

```



Fonte: Adaptado³.

Análise estatística

Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foram testados para cada *locus* dos seis polimorfismos nos dois grupos (casos e controles), usando o método Monte Carlo da Cadeia de Markov, através do programa computacional Genepop, versão 4.2 (Rousset 2008). Esse teste é utilizado principalmente como uma verificação da qualidade dos dados e permite, por exemplo, descartar *loci* que se desviam do HWE⁴.

O mapeamento e cálculo do desequilíbrio de ligação (DL) foram realizados pelo software Haploview (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>), versão 4.2, através de ambas as estatísticas D' e r^2 , que possibilitam em conjunto estabelecer o grau de co-hereditariedade dos polimorfismos, levando em conta também suas reais frequências.

As frequências dos alelos menores (do inglês, *minor allelic frequency*, MAF) foram comparadas por χ^2 , considerando $p < 0,05$. Razões de chances e intervalos de confiança de 95% foram determinados para a comparação da distribuição dos genótipos entre casos e controles.

Análise de haplótipos foi realizada usando o software Haplo.stats (versão 1.6.3), disponível na versão R, 3.5.1, usando um algoritmo de estimativa de máxima verossimilhança

(função haplo.em). O software calcula valores específicos para cada haplótipo no teste de associação caso-controle, considerando $p < 0,05$ (função haplo.score).

4.4 Avaliação funcional da sensibilidade ao glicocorticoide

Caracterização da amostra

A apresentação genotípica diploide referente aos polimorfismos estudados na população de interesse foi estimada computacionalmente. Assim, para a avaliação funcional, foi selecionada uma subamostra, dentre os casos, constituída por indivíduos com genótipo que foi estimado com 100% de certeza e cujo perfil era exclusivo de hipersensibilidade ou de resistência ao glicocorticoide, segundo apontado pela literatura^{1,2}. Foram eleitos para o teste 34 participantes, sendo que 28 estavam em boas condições de saúde e puderam participar.

Assim, a amostra final do teste funcional ($n=28$) foi constituída por 9 crianças, 9 adolescentes, 10 adultos, com idade mediana de 12 (2-34) anos; 21 (75%) do sexo feminino, 7 (25%) do sexo masculino; 21 com a forma perdedora de sal (75%), dos quais 16 (76%) estavam em uso do mineralocorticoide (fludrocortisona).

Protocolo de estudo

O estudo funcional utilizado para a avaliação da sensibilidade ao glicocorticoide foi o teste de supressão do cortisol sérico com dose muito baixa de dexametasona (do inglês, *very low-dose dexamethasone test*, VLD-DST), já bem descrito na literatura para esse fim e padronizado com a dose intravenosa de $20 \mu\text{g}/\text{m}^2$ em estudo prévio^{5,6}.

Após o consentimento, por telefone, foram convocados os participantes e obtidas as informações recentes a respeito dos medicamentos de uso contínuo, como glicocorticoide, mineralocorticoide e anticoncepcional oral (ACO). O tempo de suspensão do glicocorticoide de uso contínuo foi de 4 dias para hidrocortisona, 6 dias para prednisona e 7 dias para dexametasona, levando em conta a meia-vida biológica de cada fármaco (hidrocortisona 12-36 horas, prednisona 18-36 horas e dexametasona 36-54 horas).⁷ Após a suspensão do glicocorticoide, os participantes foram cuidadosamente monitorados por telefone. Os demais medicamentos de uso contínuo (fludrocortisona e ACO) foram mantidos.

Os participantes realizaram o teste apenas quando a 17-hidroxiprogesterona (17OHP) sérica, medida por um ensaio de quimioluminescência disponível no mercado, foi $>1000 \text{ ng/dL}$, sugerindo que não houvesse a supressão do eixo HH⁸ na véspera do teste (no último mês).

O teste funcional foi realizado no Serviço de Medicina Laboratorial do HC-UFMG, entre outubro/2018 e agosto/2019. Os participantes vestiram roupas leves e foram submetidos à avaliação clínica prévia: aferição dos dados vitais, medidas da pressão arterial sistêmica (por esfigmomanômetro Welch Allyn Tycos® devidamente calibrado e estetoscópio Littmann®); medida da altura por estadiômetro de parede e do peso, por balança digital portátil calibrada. As avaliações foram realizadas utilizando-se o mesmo equipamento e pelo mesmo examinador. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado pela relação: peso (kg)/estatura² (m); os valores do IMC para idade e sexo foram analisados em escores z para a classificação do estado nutricional, segundo a Organização Mundial de Saúde. A superfície corporal foi calculada a partir da seguinte fórmula: [peso (kg) x 4 + 7/90 + peso (kg)]⁷⁻¹⁰.

O protocolo inicial foi estabelecido exatamente conforme padronização, com dosagens do cortisol sérico basal às 08:00 horas e, 2 horas após, o fosfato dissódico de dexametasona intravenoso (Decadron® 2mg/ml, Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., Brasil). A preparação da solução também foi realizada conforme o protocolo (1 mL do produto diluído em 19 mL de solução salina 0,9%, para uma concentração final de 100 µg/mL)⁶. A dose da dexametasona infundida foi calculada de acordo com a área da superfície corporal em mg/m².

Uma fase-piloto foi realizada com amostragem por saturação, entre outubro/2018 e janeiro/2019, optando-se por ampliar o teste funcional com uma segunda administração de dexametasona em dose dobrada (40 µg/m²) e coleta de nova amostra de cortisol 2 horas após. O protocolo de estudo foi finalmente estabelecido (**Quadro 1**).

Quadro 1 – Protocolo do teste funcional

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1) Dosagem do cortisol basal (08:00 horas) 2) Infusão de dexametasona intravenosa (20 µg/m²) 3) Dosagem do cortisol sérico após 2 horas 4) Infusão de dexametasona intravenosa (40 µg/m²) 5) Dosagem final de cortisol sérico após 2 horas (~ 4 horas do basal) |
|---|

Fonte: elaborado pela autora.

Ensaio

Os procedimentos de transporte e armazenamento das amostras para análise do cortisol sérico foram realizados conforme a rotina do Serviço de Medicina Laboratorial do HC-UFG; o cortisol sérico foi analisado na própria instituição, pelo Sistema Integrado Vitros® 5600, plataforma Microwell, da Johnson & Johnson (Buckinghamshire – Reino Unido, 2009). Para esse ensaio, o intervalo de referência para o cortisol sérico era de 4,46-22,7 µg/dL, o limite de detecção de 0,1 µg/dL, e o intervalo de trabalho 0,16-61,6 µg/dL.

O Sistema Integrado Vitros® 5600 foi submetido ao processo de validação no Serviço de Medicina Laboratorial de referência, em que foram determinadas as características de desempenho a seguir, para o cortisol basal sérico (**Quadro 2**). A variabilidade intraindividual do cortisol sérico, após a dose de 20 µg/m², foi de 4,3% no estudo de referência⁶.

Quadro 2 – Características de desempenho do ensaio para o cortisol sérico pelo Sistema Integrado Vitros® 5600.

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Exatidão: Bias ou erro sistemático de -3,01% (nível 1 com coeficiente de variação de 2,65) e -2,26% (nível 2 com coeficiente de variação de 1,49). Erros totais: 7,38% e 4,72% (erro total permitido desejável de 29,8% e ótimo de 14,9%). • Coeficiente de variação intraindividual (CVi%) = 20,9% e o geral (CVg%) = 45,6%. |
|--|

Fonte: elaborado pela autora.

Análise estatística

Os genótipos foram estimados usando o software Haplo.stats (versão 1.6.3), disponível na versão R 3.5.1, usando um algoritmo de estimativa de máxima verossimilhança (função haplo.em), que leva em conta a frequência e co-hereditariedade dos polimorfismos estudados na população de interesse.

As concentrações do cortisol basal e após supressão no teste funcional foram estudadas como variáveis contínuas (média dos valores) e como reduções percentuais (F%). A principal variável de interesse foi o genótipo (polimorfismos do gene do GR). As demais variáveis foram cortisol basal, forma clínica (indivíduos virilizantes simples ou perdedores de sal), idade, sexo, uso de fludrocortisona, classe e dose do glicocorticoide, IMC e uso de ACO.

As análises univariadas foram realizadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (KW) para a comparação de medianas. O nível de significância utilizado foi $p < 0,10$, tendo em vista o tamanho da amostra.

Para os resultados do cortisol como redução em percentual foram realizados modelos de regressão linear, usando o método *backward stepwise regression*, onde o modelo final é determinado a partir do modelo com todas as covariáveis: a cada passo, é retirada a variável com o maior p-valor, até que as variáveis restantes no modelo sejam todas significativas. O nível de significância utilizado foi $p < 0,05$.

Dois modelos de efeito temporal foram construídos para estudar os níveis médios de cortisol durante o teste em comparação ao basal, separadamente para indivíduos perdedores de sal e virilizantes simples. O nível de significância utilizado foi $p < 0,05$.

Os softwares utilizados foram: R (versão 3.6.1, R Core Team, 2019), Minitab® Statistical (versão 17.1.0, 2010) e Microsoft® Excel para Mac (versão 16.32, 2019).

4.5 Financiamento

O presente trabalho foi parcialmente financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico, Brasil) e FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brasil).

REFERÊNCIAS

1. Manenshijn L, van den Akker EL, Lamberts SW, van Rossum EF. Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms an overview. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;179-198.
2. Koper JW, van Rossum EF, van den Akker EL. Glucocorticoid receptor polymorphism and haplotypes and their expression in health and disease. *Steroids* 2014; 92:62-73.
3. Gergics P, Patocs A, Majnik J, Balogh K, Szappanos A, Toth M, et al. Detection of the *BclI* polymorphism of the glucocorticoid receptor gene by single-tube allele-specific polymerase chain reaction. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006;100(4-5):161-6.
4. Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet.*2006;7(10):781-91.
5. Direk N, Dekker MJ, Luik AL, Kirschbaum C, de Rijke YB, Hofman A, et al. The very low-dose dexamethasone test in the general population: a cross-sectional study. *PLoS One.*2016;11(10): e0164448.
6. Faria CD, Cobra JF, Silva TS, Melo MR, Rocha MN, Longui CA, et al. A very low dose intravenous dexamethasone suppression test as an index of glucocorticoid sensitivity. *Horm Res.* 2008;69(6):357-362.
7. Sperling MA. *Endocrinologia Pediátrica.* [Salles AD, *et al*, trad]. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.
8. Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, Baskin LS, Conway GS, Merke DP, et al. Congenital Adrenal Hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.*2018; 103(11); 4043:3088
9. World Health Organization. *Child Growth Standards. Methods and development. Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age.* Geneva: WHO; 2006.
10. Furgan M, Haque A. Surface area in children: a simple formula. *Indian Pediatr* 2009;46(12):1085-87.

5 ARTIGOS

GLUCOCORTICOID RECEPTOR GENE POLYMORPHISMS AND HAPLOTYPES IN CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA

ABSTRACT

Background: Lifelong glucocorticoid (GC) replacement serves as the mainstay treatment for Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency (21-OHD) in its classical form. There is great variability in response to drug treatment, beyond adherence. Therefore, therapeutic management of patients with CAH remains a challenge. There are new insights into the genetic basis of variation in GC response in healthy individuals and these data point to a role for GC receptor (GR) gene polymorphisms. **Aim:** To determine the frequencies of the most studied GR gene polymorphisms and haplotypes in 21-OHD subjects compared to healthy controls. **Methods:** We investigated six single nucleotide polymorphisms of this gene involving a modified response to GC as follows: *Tth111I*, *ER22*, *23EK*, *N363S*, *BclII* and *9β* (rs10052957, rs6189, rs6190, rs56149945, rs41423247, rs6198). Each minor allelic frequency (MAF) and the most common haplotypes were determined for 102 classical-21-OHD and 163 healthy subjects for association studies. **Results:** There was strong linkage disequilibrium (LD) between the alleles. Six main haplotypes were distinguished, of which four presented the *Tth111I*-variant. Heterozygous-*Tth111I* occurred more commonly amongst cases ($p=0.004$), while heterozygous-*BclII* was more common amongst controls ($p=0.049$). There were no statistical differences in overall haplotype frequencies, except for Haplotype-4, *BclII*, which occurred less commonly amongst cases ($p=0.01795$). Results were consistent with the subjects' European ancestry. **Conclusions:** The *BclII*-haplotype, which is the most frequent one correlated with increased GC sensitivity, occurred less commonly in CAH-subjects. Further research is warranted to evaluate the clinical relevance of this statistical finding and the prognostic value of assessing GR haplotypes to guide more personalized treatment among subjects with poor clinical control.

Keywords: Glucocorticoid receptor gene polymorphism; Haplotype; Congenital Adrenal Hyperplasia.

Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) due to 21 α -hydroxylase deficiency (21-OHD) is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the *CYP21A2* gene, mapped on chromosome 6 (6p21.3). This gene is part of the genetic structure that encodes the main human histocompatibility complex (RCCX locus), containing RP protein kinase, C4, *CYP21*, and tenascin X genes.^{1,2,3} There is a genetic recombination of *CYP21A2* and its pseudogene, *CYP21A1P*, with which it shares a 98% homology. The high identity between *CYP21* genes and the organization of duplicate genes in this chromosome region favoured unequal pairing during meiosis and consequently uneven crossing-over events. Pseudogene derived variants due to gene conversion account for about 70% of *CYP21A2* causing mutations.⁴⁻¹⁰

21-OHD patients can be compound heterozygotes and have different mutations in the maternal and paternal alleles. This contributes to a broad spectrum of clinical variability, which ranges from severe or classical (CL) to mild late-onset or non-classical. CL affecting around 1:15,000¹¹ live births, is represented by two traditional phenotypes: simple virilizing (SV) and salt-wasting (SW) forms. SW-CAH, the most severe amongst the two phenotypes, accounts for an estimated 75% of CL cases. The severe impairment of the enzyme (< 1-2% activity) leads to poor cortisol production that relieves negative feedback to the hypothalamus and the pituitary gland. In response, the secretion of corticotropin-releasing hormone (CRH) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) are amplified, resulting in hyperplasia of the adrenal cortex.^{12,13}

Lifelong glucocorticoid (GC) replacement serves as the CL mainstay treatment (added fludrocortisone in SW). In childhood, the conventional therapy is a body surface area-related thrice daily hydrocortisone regimen, as its shorter half-life minimizes the effects of more potent and longer-acting GCs on linear growth. However, most patients will have very low levels of cortisol in the early hours of the morning because hydrocortisone cannot replicate the normal circadian rhythm in cortisol levels. Oral hydrocortisone presents a good bioavailability, but considerable interpersonal variability in its pharmacokinetics is expected due to fast drug metabolizers.¹⁴⁻¹⁶

Sub-treatment often due to non-adherence leads to hyperandrogenism, virilization and progressive advancement of bone age. On the other hand, hypercortisolism can lead to obesity, important reduction in growth rate and progressive loss of bone mass. Both GC excess and hyperandrogenism correlate with short stature in adulthood.¹⁷⁻¹⁹ Thus, the greatest therapeutic goal in CL treatment is to replace GCs while avoiding androgen excess, preventing nocturnal ACTH peak levels, but without the major side effects of long-term basis GC use.

The therapeutic management of patients with CAH remains a challenge. There is great variability in response to drug treatment, beyond adherence.^{20,21}

The cellular response to GCs displays profound variability both in magnitude and in specificity of action. Tissue sensitivity to GCs differs amongst individuals, within tissues of the same individual and within the same cell, depending on the cycle phase. The actions of GCs are mediated by the GC receptor (GR), which is an intracellular transcription factor.²²

Multiple mechanisms generate diversity and specificity in the GC response^{23,24}. There are new insights into the genetic basis of variation in GC response in healthy individuals and these data point to a role for GC receptor (GR) gene polymorphisms. The GR, which is encoded by the *NR3C1* gene (*Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1*), is implicated in a broad spectrum of functions that are essential for life and maintenance of basal and stress-related homeostasis.^{25,26} Specific arrangements of the GR polymorphisms could explain, at least in part, the interindividual variability of GC response, which may be relevant for CL clinical management^{27,28}.

Given this evidence, the aim of the present study was to evaluate the frequencies of the most relevant single nucleotide polymorphisms (*Tth111I*, *ER22*, *23EK*, *N363S*, *BclI*, *9β*)^{29,30} and correlated haplotypes of this gene in patients with 21-OHD, compared to healthy controls.

Methods

We have investigated the most studied polymorphisms of the GR gene (*Tth111I*, *ER22*, *23EK*, *N363S*, *BclI* and *9β*)^{29,30} and estimated each minor allelic frequency (MAF) and haplotypes, compared to healthy controls.

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. All of the children, adolescents and legal guardians signed an informed written consent after receiving information concerning the study.

Subjects

The population of interest was composed of 102 21-OHD unrelated subjects, aged 8.95 years [interquartile range (IQR) 2.13-17.95]; 73 females (71.6%) and 29 males (28.4%). Most patients (93%) were SW and 7% SV. The diagnosis was based on clinical and biochemical evaluation and all girls reported ambiguous genitalia at birth. No participant had another chronic illness or took medication other than hormone replacement therapy for CAH and low-dose oral

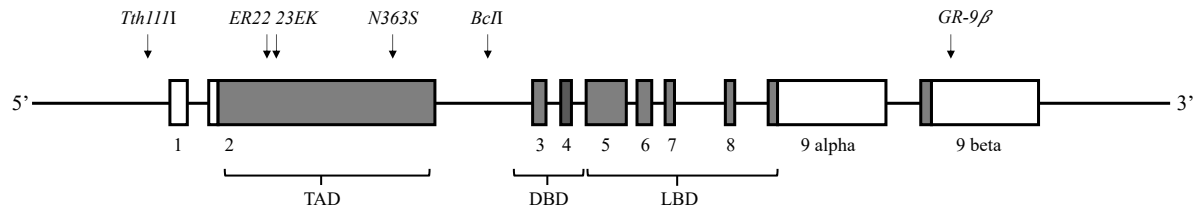
contraceptives. They were recruited in 2016 and were under regular monitoring and treatment at the Endocrinology Ambulatory Care Centre (UFMG).

The control group consisted of 163 healthy unrelated subjects from the same geographic area (Minas Gerais State, Brazil), aged 31 years (IQR 27-41), from which 105 were females (64.4%) and 58 males (35.6%). They did not present any chronic disease or took medications regularly and were recruited at the institution (UFMG) Primary Care Centre from 2010 to 2013.

Genotyping

The human GR gene (*NR3C1*) is located in chromosome 5 (5q31.3)³¹ and spans a length of 157,582 bases. It is comprised of 13 first non-coding exons, designated 1_{A-J} (excluding "G"), which act as alternative promoters, and 8 protein coding regions or exons (numbered 2-9).

For our study, participants had blood samples collected at UFMG Laboratory Medical Service and were then genotyped for the most relevant single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the GR gene: *Tth1111*, *ER22*, *23EK*, *N363S*, *BcII* and *GR-9 β* . A schematic genomic view is presented in **figure 1**.



Tth1111: in flanking area; *ER22*, *23EK*, *N363S*: exon 2 at TAD; *BcII*: intron between exons 2 and 3; *9 β* : exon 9
TAD: transactivation domain; DBD: DNA binding domain; LBD: ligand binding domain

Figure 1. Schematic representation and localization of the *NR3C1* gene polymorphisms *Tth1111*, *ER22*, *23EK*, *N363S*, *BcII* and *9 β* (rs10052957, rs6189, rs6190, rs56149945, rs41423247, rs6198) Adapted³².

The DNA was extracted from the buffy coat of peripheral blood mononuclear cells according to standard techniques (<https://www.qiagen.com/us/>). After isolation, DNA was quantified using the NanoVue Plus spectrophotometer (GE Healthcare). Re-dilution of solutions were made to bring the final concentration to approximately 50 ng/ μ L.

For allelic discrimination, predesigned TaqManTM (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) SNP genotyping assays probes (rs10052957, rs6189, rs6190, rs56149945, rs6198), TaqManTM Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 50 ng of DNA were prepared.

A real-time PCR device (Applied Biosystems, QuantStudio 3 Real-Time PCR System, 96-well thermal blocks/ QuantStudio™ Design and Analysis Software v1.4.1) was used according to the following protocol: samples were exposed to 95° C for 10 min, 50 cycles at 95° C for 15s and at 60° C for 1 min.

DNA samples were investigated for *BcII* polymorphism (rs41423247) using Restriction Fragment Length (RFLP) analysis according to previous technique published.³³ Described in basic terms, the PCR amplification product was digested by a restriction enzyme and the fragments were separated by 2% agarose gel electrophoresis.

Homozygous and heterozygous genotypes were determined by the size of the restriction-generated fragments when compared to the 100 bp molecular weight standard (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas). The *BcII*-enzyme recognizes and cleaves the restriction site 5'... T ↓ GATCA ...' 3'. Thus, the fragment containing the homozygous wild allele C, when cleaved, generates fragments of 267 bp and 151 bp. The 418 bp fragment containing the homozygous mutant G allele has no restriction site, remaining the same size after cleavage. The heterozygous genotype was identified when the three fragments were present (418 bp, 267 bp and 151 bp).

Statistical Analysis

Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were tested for each locus and group using a Markov Chain Monte Carlo method in Genepop, 4.2 version (Rousset 2008).

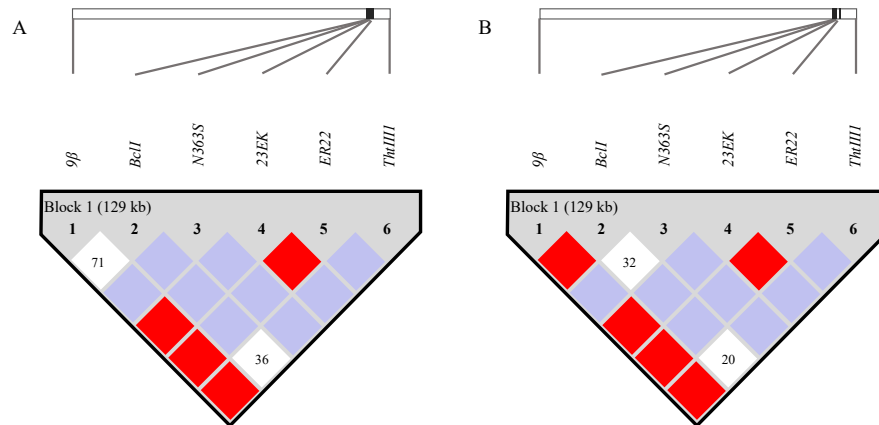
Linkage disequilibrium (LD) mapping was computed with Haploview software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>), 4.2 version, measured by both D' and r² statistics.

Minor allelic frequencies (MAF) were compared through χ^2 and significance was taken at the $p < 0.05$ level. Odds ratios and 95% confidence intervals were determined for genotype distribution (case/control data). Haplotype and genotype analysis were performed using Haplo.stats package (1.6.3 version) available in R, 3.5.1 version, using a maximum likelihood estimation algorithm (haplo.em function) for all SNPs. The software calculates specific values for each haplotype in the case-control association test, considering $p < 0.05$ (haplo.score function).

Results

All polymorphisms were in Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE). The first schematic plot (**figure 2**) shows very strong linkage disequilibrium (LD) between the most studied SNPs,

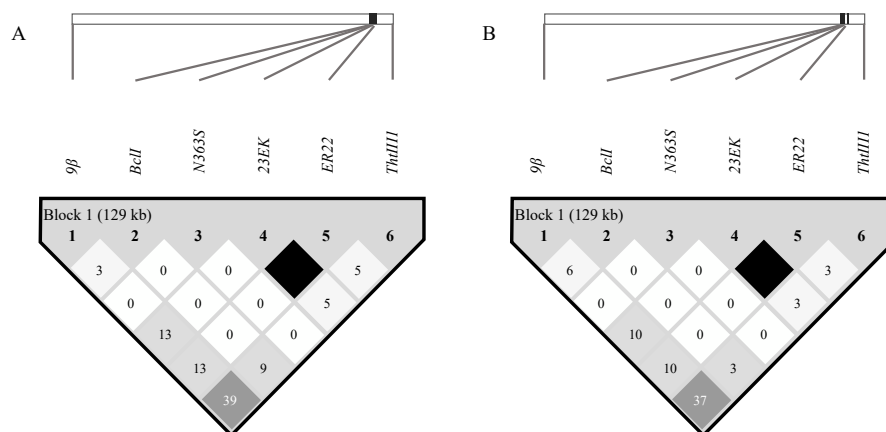
without major differences between cases and controls, through D' . Complementary r^2 analysis suggested that only *ER22* and *23EK* display complete LD (**figure 3**).



Genomic organization of polymorphisms (from 3' to 5') is indicated in the upper part of the figure. Panels indicate in red: strong pairwise LD; in white: LD is weak or non-existent; in lilac: intermediate LD between SNPs.

LD: linkage disequilibrium; SNPs: single nucleotide polymorphism
CAH: Congenital Adrenal Hyperplasia

Figure 2. Linkage disequilibrium between the polymorphisms *TthIII*, *ER22*, *23EK*, *N363S*, *BclII* and *9β* (rs10052957, rs6189, rs6190, rs56149945, rs41423247, rs6198) mapping through D' in 102-CAH subjects (A) and a control group of 163 healthy controls (B)



Genomic organization of polymorphisms (from 3' to 5') is indicated in the upper part of the figure. Panels indicate in black: complete pairwise LD between the adjacent SNPs; in white: LD is not significant; in shades of grey: intermediate LD.

LD: linkage disequilibrium; SNPs: single nucleotide polymorphism
CAH: Congenital Adrenal Hyperplasia

Figure 3. Linkage disequilibrium between the polymorphisms *TthIII*, *ER22*, *23EK*, *N363S*, *BclII* and *9β* (rs10052957, rs6189, rs6190, rs56149945, rs41423247, rs6198) mapping through r^2 in 102-CAH subjects (A) and control group of 163 healthy controls (B)

Genotype analysis (**table 1**) showed that heterozygous *Tth1111* (GA) occurred much more commonly amongst cases ($p=0.004$), while heterozygous *BclI* (CG) was more common amongst controls ($p=0.049$). There were no significant differences in MAFs.

Table 1. Minor allelic frequencies and genotype distribution of the polymorphisms *Tth1111*, *ER22/23EK*, *N363S*, *BclI* and *9 β* (rs10052957, rs6189, rs6190, rs56149945, rs41423247, rs6198) in 102 CAH-subjects compared to 163 healthy controls

Minor allele	Cases (n=102)	Controls (n=163)	χ^2	<i>p</i> -value
<i>Tth1111</i>	32.8%	25.8%	2.931	0.0869
<i>ER22</i>	2.5%	3.3%	0.300	0.5842
<i>23EK</i>	2.5%	3.3%	0.300	0.5842
<i>N363S</i>	0.5%	1.7%	1.414	0.2345
<i>BclI</i>	26%	32.7%	2.561	0.1095
<i>9β</i>	16.2%	11.6%	2.202	0.1378

Genotype			OR. (95% CI)	<i>p</i> -value
<i>Tth1111</i>				
G>A				
GG	42%	58%	1.0	
GA	50%	31%	2.186 (1.287-3.714)	0.004
AA	8%	10%	1.166 (0.459-2.957)	0.747
<i>ER22/23EK</i>				
C>T				
CC	95%	97%	1.0	
CT	5%	3%	1.907 (0.499-7.28)	0.345
TT	0	0		
<i>N363S</i>				
T>C				
TT	99%	97%	1.0	
TC	1%	3%	0.282 (0.031-2.566)	0.261
CC	0	0		
<i>BclI</i>				
C>G				
CC	56%	43%	1.0	
CG	36%	48%	0.581(0.338-0.998)	0.049

GG	8%	9%	0.702 (0.267-1.842)	0.472
9β				
T>C				
CC	70%	79%	1.0	
TC	28%	19%	0.587 (0.324-1.061)	0.078
TT	2%	2%	1.136 (0.185-6.964)	0.890

CAH: Congenital Adrenal Hyperplasia; OR: odds ratio; CI: confidence interval; χ^2 : chi-square

Estimation of LD (D') showed that 9β variant was inherited together with all other polymorphisms in both groups. However, a thorough analysis considering MAFs data within the same group, reveal that 9β was weakly correlated with *ER22/23EK* ($D'=1$; $r^2=0.10-0.13$) and moderately with *Tth111I* ($D'=1$; $r^2=0.37-0.39$), in correspondence to their low and intermediate MAFs, respectively.

There were no statistical differences in overall haplotype frequencies, except for the Haplotype 4 (*BclII*), which occurred less commonly amongst cases ($p=0.01795$). Haplotypes 7 (*N363S*); 8 (*N363S + BclII*) and 9 (*Tth111I + N363S + BclII*) were not included in the analysis, because of their low frequencies ($< 1\%$). Haplotype distribution is shown in **table 2**.

Table 2. Haplotypes distributions of the polymorphisms *Tth111I*, *ER22/23EK*, *BclII* and 9β (rs10052957, rs6189, rs6190, rs41423247, rs6198) in 102 CAH-subjects compared to 163 healthy controls

Haplotypes	Alleles	Cases	Controls	OR. (95% CI)	p- value
		(n=102)	(n=163)		
1	Wild	55.3%	53%	1.0	0.8063
2	<i>Tth111I + BclII</i>	13.2%	11.9%	1.01 (0.58-1.77)	0.700182
3	<i>Tth111I + 9β</i>	12.3%	9.9%	1.30 (0.7-2.39)	0.22685
4	<i>BclII</i>	11.3%	19.9%	0.56 (0.31-0.99)	0.01795
5	<i>Tth111I</i>	3.4%	2.1%	1.64 (0.46-5.86)	0.28547
6	<i>Tth111I + ER22/23EK + 9β</i>	2.5%	1.2%	1.19 (0.4-3.53)	0.29234

CAH: Congenital Adrenal Hyperplasia; OR: odds ratio; CI: confidence interval

Discussion

In our series, we found differences in haplotype distribution and LD patterns of GR gene polymorphisms in CAH-subjects compared to healthy controls. All gene variants were in HWE, although random mating criteria was not fully guaranteed, since CAH is an autosomal recessive

disease, suggesting that consanguineous marriages were much more frequent among this group.³⁴

The pattern of LD in the human genome appears to be highly non-random, with well-defined blocks in which only a small proportion of all possible haplotypes account for most observed variation, separated by regions of relatively low LD. In our series, quite substantial LD was observed in agreement with the literature, although some data may bias upward due to our relatively small samples. LD occurs for a number of reasons, including random drift in allele frequencies, leading to chance associations in finite populations; non-random mating based on joint genotypes; mixtures of subpopulations with different allele frequencies; mutation or founder effects; and natural selection for or against a particular combination of alleles³⁵. The strong LD of the *NR3C1* gene variants and its low recombination rate across 157,582 bases lead to high LD and several haplotype combinations of SNPs.

These gene haplotypes are described in the literature according to ethnicity. Brazil is a continental country (8,514,876 km²) with 26 states divided into five regions. It presents a very heterogeneous population due to a trihybrid ancestry and five centuries of heterogeneous miscegenation. European ancestry accounts for 60-77% of Brazilians' genetic background and is followed by African and Amerindian ancestries. The Southern region displays a greater European ancestry (77%) than other regions; individuals from the Northeast Brazil display the highest African ancestry contribution (27%) whereas individuals from the North regions display the highest Amerindian ancestry contribution (32%) (**figure 4**).^{36,37}

This study was conducted in Minas Gerais State (586,528 km²), located in the Southeast region, where ancestry proportions were estimated as 74.2% European, 17.3% African and 7.3% Amerindian³⁷.



Pie charts showing in red: Amerindian ancestry; in black: African ancestry; in grey: European ancestry

Figure 4. Geographic map showing the Brazilian population ancestry represented by the states of Minas Gerais, Amazonas, Bahia and Rio Grande do Sul. Adapted³⁶.

The GR haplotypes distribution in our study have a lot in common with others described in European sets (**tables 3 and 4**).

Table 3. Haplotype distribution of the polymorphisms *ThtIII*, *ER22/23EK*, *BcII* and *9β* (rs10052957, rs6189, rs6190, rs41423247, rs6198) and in 102 CAH-subjects, 163 healthy controls and from Dutch cohorts

Haplotypes	Alleles	Cases (n=102)	Controls (n=163)	Dutch Cohort* (n=10000)
1	Wild	55.3%	53%	42%
2	<i>ThtIII</i> + <i>BcII</i>	13.2%	11.9%	14%
3	<i>ThtIII</i> + <i>9β</i>	12.3%	9.9%	14%
4	<i>BcII</i>	11.3%	19.9%	23%
5	<i>ThtIII</i>	3.4%	2.1%	< 1%
6	<i>ThtIII</i> + <i>ER22/23EK</i> + <i>9β</i>	2.5%	1.2%	2.5%

CAH: Congenital Adrenal Hyperplasia

Table 4. Minor allelic frequencies of the polymorphisms *Tth1111*, *ER22/23EK*, *BcII* and *9β* (rs10052957, rs6189, rs6190, rs41423247, rs6198) in 102 CAH-subjects, 163 healthy controls and from the 1000 Genomes Project³⁸

Polymorphism	Cases (n=102)	Controls (n=163)	Total (n=5008)	Europe (n=1006)	Africa (n=1322)	America (n=694)
<i>Tth1111</i>	32.8%	25.8%	22.1%	32.1%	26.6%	20.4%
<i>ER22/23EK</i>	2.5%	3.3%	1.06%	2.98%	-	0.58%
<i>N363S</i>	0.5%	1.7%	0.6%	1.79%	0.08%	1.15%
<i>BcII</i>	26%	32.7%	25.4%	37.9%	20%	26.3%
<i>9β</i>	16.2%	11.6%	8.3%	17.4%	2.3%	9.5%

CAH: Congenital Adrenal Hyperplasia

Our comparative genotype analysis showed that heterozygous *Tth1111* (GA) occurred more commonly amongst cases, while heterozygous *BcII* (CG) was more common among controls. These findings have considerably impacted the haplotype distribution and ranking amongst groups: except for the wild-haplotype, *BcII* was the most common haplotype amongst controls, while it occupies the third place amongst cases. HWE also showed that the disease (CAH) risk *per se* does not directly correlate to the evaluated polymorphisms. Therefore, we assumed that the diversity within this population drove the observed genotype differences. However, the hypothesis that *Tth1111* is in fact more common amongst CAH-subjects, should not be ruled out given the statistical significance found in our analysis.

Besides *Tth1111* and *BcII*, heterozygous *9β* was also frequent in our series. These variants also exist commonly amongst Europeans', reinforcing our ancestry trend.

Two other cohorts with CAH patients, from São Paulo State, at Southeast Brazil, with 41 children/ adolescents³⁹, and 68 adults⁴⁰, revealed: *BcII* MAFs of 23.1% and 26.4%; and *9β*'s of 9.7% and 9.6%, respectively. These studies tested the influence of the two polymorphisms on CAH patients' metabolic profile and found that *BcII* might play a role in obesity in adults; and *9β* could be involved with a susceptibility to adverse lipid profile in children and adolescents. Previous data showed relationships between altered GC sensitivity and changes in both body composition and metabolic parameters mediated by *NR3C1* gene polymorphisms also in healthy subjects.⁴¹

Tth1111, *ER22/23EK* and *9β*-variants usually correlate to GC resistance in the literature^{29,30}. *Tth1111* polymorphism consists of G>A nucleotide exchange and is located near the distal promoter region of the gene, in an intronic region between alternative exons 1. It has been studied in association with other polymorphisms, mainly *ER22/23EK*. *Tth1111*

polymorphism has been previously correlated with higher basal⁴² and pos-dexamethasone⁴³ cortisol values, although it might not have autonomous effects. The effects probably stemmed from the association of this variant with either *9β* or *ER22/23EK* polymorphisms⁴³. Studies in carriers also explored a possible link to GC resistance phenotypes in asthma⁴⁴, cardiovascular risk⁴⁵ and psychiatric comorbidities.^{46,47}

The *ER22* and *23EK* variants are usually described together in the literature, since they include two adjacent codons (22 and 23) and are in perfect LD ($D'=1$ and $r^2=1$), as we confirmed in our series. They were inherited with other common alleles (with high D'), but they are quite rare, which explains the low r^2 . Both variants are correlated with reduced transactivation capacity, since they are located in the transactivation domain of the GC gene. Mechanisms on transrepression has been reported, suggesting other as yet unclear indirect actions associated with these polymorphisms.^{29,30} The change in DNA sequence is from GAG/AGG to GAA/AAG, with translation for glutamic acid/ arginine (E-R) and glutamic acid/ lysine (E-K), respectively. Molecular studies show 15% increase in the translation variants proportion ($GR\alpha_A/GR\alpha_B$) among carriers, which seems to be associated with increased GC resistance.⁴⁸ *Tth1111*, *ER22/23K*-variants carriers show less cortisol suppression on a dexamethasone suppression test (DST), compared to only *Tth1111* carriers⁴³. Better metabolic and cardiovascular health profiles were reported among carriers^{48,50}.

The *9β* polymorphism leads to more stable expression of the GC receptor gene splicing variable, GR-β, and may thereby decrease GC sensitivity, once it compasses a dominant negative effect⁵¹. It leads to a T>C nucleotide substitution, located in the 3'-UTR of exon *9β*, the terminal exon of the mRNA of the β isoform. This untranslated region (UTR) is located just after the terminating signal of the coding region and signals with 'ATTTA' motifs the end of protein synthesis of the β isoform.^{29,30} The nucleotide substitution, located in this 'ATTTA' motif (changing it to GTTTA), is known to destabilize mRNA and decrease receptor protein expression *in vitro*⁵¹. It has been associated with a clinical phenotype consistent with effects of reduced GC sensitivity on the immune system⁵². Recently, another common variant of the GR-9β has been associated to the *G3134T* polymorphism⁵⁴.

The *N363S* and *BclII* polymorphisms are commonly correlated to GC increased sensitivity. The *BclII*-variant occurs quite commonly, therefore it is the most studied polymorphism to date. Located between exons 2 and 3, this variant is a specific fragment of DNA that is removed by an endonuclease-restriction enzyme⁵⁵. It has been associated with increased body fat in adults⁴¹ and higher cardiovascular risk in individuals with autoimmune adrenal insufficiency⁵⁶ and CAH⁴⁰. Several psychiatric disorders in childhood and

adolescence⁵⁷⁻⁵⁹ and major depression in adults are more common amongst carriers⁶⁰. The exact mechanism by which this polymorphism affects GC sensitivity is not yet elucidated, but carriers show higher GC sensitivity, given the lower suppressed cortisol levels following DST.⁴³

N363S polymorphism is located in the GC gene transactivation domain, leading to the exchange of the amino acid asparagine (N) for serine (S), in codon 363. The variant was associated with better disease outcomes in a cohort with CAH paediatric patients. Girls who were carriers presented milder genital virilization than non-carriers; the obesity pattern seems to be also modified among carriers. MAF was equivalent to that of the general population.⁶⁰ This polymorphism was also studied, *in vitro* and *in vivo*, associated with higher transactivation capacity, as demonstrated by DST. In the elderly it has been associated with an increased BMI and decreased trabeculated bone mass.^{62,63} A molecular study shows that changes in the receptor protein modify the regulation of important genes, which act in cell growth and nucleic acid metabolism.⁶⁴

In conclusion, heterozygous-*Tth1111* occurred more commonly amongst cases, while heterozygous-*BcII* was more common amongst controls. The *BcII* GR-haplotype, which is the most frequent one correlated with increased GC sensitivity, occurred less commonly in CAH-subjects. Further research is warranted to evaluate the clinical relevance of this statistical finding and the prognostic value of assessing GR haplotypes to guide more personalized treatment in patients with CAH and GC resistance.

Acknowledgements

This study was partially supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico, Brazil) and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil).

Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest.

References

1. White PC, New MI, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci USA*.1986;83(14):5111-5.
2. Haglund-Stengler B, martin Ritzén E, Gustafsson J, Luthman H. Haplotypes of the steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA*.1991;88(19):8352-6.

3. Yang Z, Mendoza AR, Welch TR, Zipf WB, Yu CY. Modular variations of the human major histocompatibility complex class III genes for serine, threonine kinase RP, complement component C4, steroid 21-hydroxylase CYP21, and tenascin TNX (the RCCX module). A mechanism for gene deletions and disease associations. *J Biol Chem.* 1999;274(17):12147-56.
4. Shmouni FH, Chen W, Merke DP. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23(2):181-192.
5. Mello MP, Bachega TASS, Costa, SM, Mermejo, LM, Castro M. Bases Moleculares da Hiperplasia Adrenal Congênita. *Article in portuguese.* *Arq Bras Endocrinol Metab* [Internet]. 2002;46(4):457-477.
Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302002000400017&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302002000400017>.
6. Concolino P, Costella A. Congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency: a comprehensive focus on 233 pathogenic variants of *CYP21A2* gene. *Mol Diagn Ther.*2018;22(3):261-280.
7. Werkmeister JW, New MI, Dupont B, White PC. Frequent deletion and duplication steroid 21-hydroxylase genes. *M J Hum Genet.* 1986;39(4):461-9.
8. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev.*2000;21(3):245-91.
9. Tusié-Luna MT, White PC. Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase gene) and CYP21P involve different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(23):10796-800.
10. Krone N, Arlt W. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23(2):181-92.
11. Pang S, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: newborn screening and its relationship to the diagnosis and treatment of the disorder. *Screening.* 1993;2(2-3): 105-139.
12. Falhammar H, Nordenström A. Nonclassic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: clinical presentation, diagnosis, treatment, and outcome. *Endocrine.* 2015;50(1):32-50.
13. Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, Baskin LS, Conway GS, Merke DP, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.*2018;103(11):4043-4088.

14. Patel RB, Rogge MC, Selen A, Goehl TJ, Shah VP, Prasad VK, et al. Bioavailability of hydrocortisone from commercial 20 mg tablets. *J Pharm Sci.* 1984;73(7):964-6.
15. Johnson TN, Whitaker MJ, Keevil B, Ross RJ. Bioavailability of oral hydrocortisone corrected for binding proteins and measured by LC-MS/MS using serum cortisol and salivary cortisone. *J Bioequiv Availab.*2018;10(1):001-3.
16. Mah PM, Jenkins RC, Rostami-Hodjegan A, Newell-Price J, Doane A, Ibbotson V, et al. Weight-related dosing, timing and monitoring hydrocortisone replacement therapy in patients with adrenal insufficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;61(3):367-75.
17. Dayal D, Aggarwal A, Seetharaman K, Muthuvel B. Central precocious puberty complicating congenital adrenal hyperplasia: north Indian experience. *Indian J Endocrinol Metab.*2018;22(6):858-859.
18. Maheshwari A, Khadilkar V, Gangodkar P, Khadilkar A. Long-term growth in congenital adrenal hyperplasia. *Indian J Pediatr.* 2019;86(2):154-158.
19. Juan L, Huamei M, Zhe S, Yanhong L, Hongshan C, Oiuli C, et al. Near-final height in 82 patients with congenital adrenal hyperplasia due to classic 21-hydroxylase deficiency: a single-center study of China. *J Pediatr Endocrinol Metab.*2016;29(7):841-8.
20. Viiayan R, Bhavani N, Pavithran PV, Nair V, Menon UV, Menon AS, et al. Metabolic profile, cardiovascular risk factors and health-related quality of life in children, adolescents and young adults with congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2019;32(8):871-877.
21. Reisch N. Review of health problems in adult patients with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.*2019;127(2-03):171-177.
22. Nicolaidis NC, Charmandari E, Chrousos GP, Kino T. Recent advances in molecular mechanisms determining tissue sensitivity to glucocorticoids: novel mutations, circadian rhythm and ligand-induced repression of the human glucocorticoid receptor. *BMC Endocr Disord.*2014;14-41.
23. Longui CA, Faria CD. Evaluation of glucocorticoid sensitivity and its potential clinical applicability. *Horm Res.*2009;71(6):305-9.
24. Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Exploring the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action from sensitivity to resistance. *Endocr Dev.* 2013; 24:41-56.
25. Nicolaidis NC, Charmandari E. Glucocorticoid resistance. *Expl Suppl.*2019;111: 85-102.
26. Nicolaidis NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids.*2010;75(1):1-12.

27. Saka N, Güven M, Bas F, Darendeliler F, Bundak R, Günöz H, et al. Glucocorticoid receptors in patients with congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Endocrinol Metab.*2000;13(8):1101-7.
28. Nebesio TD, Renbarger JL, Nabhan ZM, Ross SE, Slaven JE, Li L, et al. Differential effects of hydrocortisone, prednisone, and dexamethasone on hormonal and pharmacokinetic profiles: a pilot study in children with congenital adrenal hyperplasia. *Int J Pediatr Endocrinol.*2016;2016:17.
29. Manenschijn L, van den Akker EL, Lamberts SW, van Rossum EF. Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms. An overview. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;179-98.
30. Koper JW, van Rossum EF, van den Akker EL. Glucocorticoid receptor polymorphisms and haplotypes and their expression in health and disease. *Steroids.*2104;92:62-73.
31. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, et al. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature.* 1985;318(6047):635-41.
32. Melief J, Koper JW, Endert E, Møller HJ, Hamann J, Uitdehaag BM, et al. Glucocorticoid receptor haplotypes conferring increased sensitivity (*BclI* and *N363S*) are associated with faster progression of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2016; 299:84-89.
33. Gergics P, Patocs A, Mainik J, Balogh K, Szappanos A, Toth M, et al. Detection of the *BclI* polymorphism of the glucocorticoid receptor gene by single tube allele-specific polymerase chain reaction. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006;100(4-5):161-6.
34. Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet.*2006;7(10):781-91.
35. Thomas DC. *Statistical methods in genetic epidemiology.* 1st ed. New York: Oxford University Press, Inc; 2004. Chapter 8, Principles of population genetics; p.227-52.
36. Souza AM, Resende SS, Souza TN, Brito CFA. A systematic scoping review of the genetic ancestry of Brazilian population. *Genet Mol Biol.* 2019;42(3):495-508.
37. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy FS, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One.*2011;6(2): e17063.
38. 1000 Genome Project [internet]. 2020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>

39. Moreira RP, Gomes LG, Madureira G, Mendonça BB, Bachega TA. Influence of the *A3669G* glucocorticoid receptor gene polymorphism on the metabolic profile of pediatric patients with congenital adrenal hyperplasia. *Int J Endocrinol.*2014;2014:594710.
40. Moreira RP, Gomes LG, Mendonça BB, Bachega TA. Impact of glucocorticoid receptor gene polymorphisms on the metabolic profile of adult patients with the classical form of 21-hydroxylase deficiency. *PLoS One.*2012;7(9): e44893.
41. Geelen CC, van Greevenbroek MM, van Rossum EF, Schaper NC, Nijpels G, et al. *BclII* glucocorticoid receptor polymorphism is associated with greater body fatness: the Hoorn and CODAM studies. *Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(3): E595-9.
42. Rosmond R, Chagnon YC, Chagnon M, Pérusse L, Bouchard C, Björntorp P. A polymorphism of the 5' flanking region of the glucocorticoid receptor gene locus is associated with basal cortisol secretion in men. *Metabolism.*2000;49(9):1179-9.
43. van Rossum EF, Roks PH, de Jong FH, Brinkmann AO, Pols HA, Koper JW, et al. Characterization of a promoter polymorphism in the glucocorticoid receptor gene and its relationship to three other polymorphisms. *Clin Endocrinol (Oxf).*2004;61(5):573-81.
44. Panek M, Pietras T, Fabijan A, Miłanowski M, Wieteska L, Górski P, et al. Effect of glucocorticoid receptor gene polymorphisms on asthma phenotypes. *Exp Ther Med.* 2013;5(2):572-80.
45. Yan YX, Dong J, Wu LJ, Shao S, Zhang J, Zhand L, et al. Associations between polymorphisms in the glucocorticoid-receptor gene and cardiovascular risk factors in a Chinese population. *J Epidemiol.* 2013;23(5):389-95.
46. Shatzberg AF, Keller J, Tennakoon L, Lembke A, Williams G, Kraemer FB, et al. HPA axis genetic variation, cortisol and psychosis in major depression. *Mol Psychiatry.*2014;19(2):220-7.
47. Schote AB, Jäger K, Kroll SL, Vonmoos M, Hulka LM, Meyer J, et al. Glucocorticoid receptor gene variants and lower expression of *NR3C1* are associated with cocaine use. *Addict Biol.* 2019;24(4):730-42.
48. Russcher H, van Rossum EF, de Jong FH, Brinkmann AO, Lamberts SW, Koper JW. Increased expression of the glucocorticoid receptor-A translational isoform as a result of the *ER22/23EK* polymorphism. *Mol Endocrinol.* 2005;19(7):1687-96.
49. Kuningas M, Mooijaart SP, Slagboom PE, Wetendorp RG, van Heemst D. Genetic variants in the glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) and cardiovascular disease risk. The Leiden 85-plus Study. *Biogerontology.*2006;7(4):231-8.

50. van Rossum EF, Koper JW, Huizenga NA, Uitterlinden AG, Janssen JA, Brinkmann AO, et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids *in vivo*, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes*.2002;51(10):3128-34.
51. Derijk RH, Shaaf MJ, Turner G, Datson NA, Vreugdenhil E, Cidlowjki J, et al. A human glucocorticoid receptor gene variant that increase the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*.2001;28(11):2383-8.
52. Schaaf MJ, Cidlowski JA. AUUUA motifs in the 3'UTR of human glucocorticoid receptor alpha and beta mRNA destabilize mRNA and decrease receptor protein expression. *Steroids*.2002;67(7):627-36.
53. Van den Akker EL, Russcher H, van Rossum EF, Brinkmann AO, de Jong FH, Hokken A, et al. Glucocorticoid receptor polymorphism affects transrepression but not transactivation. *J Clin Endocrinol Metab*.2006;91(7):2800-3.
54. Kaya Z, Caglayan S, Akkiprik M, Aral C, Ozisik G, Ozata M, et al. Impact of glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) polymorphisms in Turkish patients with metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest*.2016;39(5):557-66.
55. Williams RC. Restriction fragment length polymorphism (RFLP). *AM L Phys Anthropol*. 1989;32(s10):159-184.
56. Giordano R, Marzotti S, Berardelli R, Karamouzis I, Brozzetti A, D'Angelo V, et al. BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with increased obesity, impaired glucose metabolism and dyslipidemia in patients with Addison's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*.2012;77(6):863-70.
57. Schote AB, Bonenberger M, Pálmason H, Seitz C, Meyer J, Freitag CM. Glucocorticoid receptor variants in childhood attention-deficit/ hyperactivity disorder and comorbid psychiatric disorders. *Psychiatry Res*. 2016; 246:275-83.
58. Dmistrzak-Weglarz M, Szczepankiewicz A, Slopian A, Tyszkiewicz M, Maciukiewicz M, Zaremba D. Association of the glucocorticoid receptor gene polymorphism and their interaction with stressful life events in Polish adolescent girls with anorexia nervosa. *Psychiatr Danub*.2016;28(1):51-7.
59. Castellini G, Lelli L, Tedde A, Piaceri I, Bagnoli S, Lucenteforte E, et al. Analyses of the role of the glucocorticoid receptor gene polymorphism (rs41423247) as a potential moderator in the association between childhood overweight, psychopathology, and clinical

- outcomes in Eating Disorders patients: 6 years follow up study. *Psychiatry Res.* 2016; 243:156-60.
60. Peng Q, Yan H, Wen Y, Lai C, Shi L. Association between NR3C1 rs41423247 polymorphism and depression: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*.2018;97(39): e12541.
61. Luczay A, Török D, Ferenczi A, Majnik J, Sólyom J, Fekete G. Potential advantage of *N363S* glucocorticoid receptor polymorphism in 21-hydroxylase deficiency. *Eur J Endocrinol.* 2006;154(6):859-64.
62. Russcher H, Smit P, van den Akker EL, van Rossum EF, Brinkmann AO, de Jong FH, et al. Two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene directly affect glucocorticoid-regulated gene expression. *J Clin Endocrinol Metab.*2005;90(10):5804-10.
63. Huizenga NA, Koper JW, De Lange P, Pols HA, Stolk RP, Burger H, et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.*1998;83(1):144-51.
64. Jewell CM, Cidlowski JA. Molecular evidence for a link between the *N363S* glucocorticoid receptor polymorphism and altered gene expression. *J Clin Endocrinol Metab.*2007;92(8):3268-77.

PHARMACOGENOMIC MARKERS OF GLUCOCORTICOID RESPONSE IN CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA

ABSTRACT

Background: Glucocorticoids (GC) are the mainstay of treatment for Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) due to steroid 21-hydroxylase deficiency (21-OHD) in its classical (CL) form. Pharmacogenomics may predict the GC response in 21-OHD-CL-patients and prevent long-term side effects. There are novel insights into the genetic basis of the GC diversity that point to an important role for GC receptor (GR) gene polymorphisms. **Aim:** To investigate whether five GR gene polymorphisms (*Tth111I*, *ER22*, *23EK*, *BcII* and *9β*/rs10052957, rs6189, rs6190, rs41423247, rs6198) are associated to different GC response in a cohort of 21-OHD-CL subjects. **Methods:** GR genotype-phenotype associations were explored after a dexamethasone suppression test (DST) using very low-doses (20 and 40 µg/m²). Out of 28 subjects aged 12 (2-34) years enrolled in this study, 75% were females and 25% were males; 75% presented the salt-wasting form (SW) and 25% the simple virilizing form (SV). **Results:** Subjects who carried *Tth111I* and *9β*, associated or not to the *ER22/23EK* variants, showed an impaired DST response compared to *BcII*-carriers. All non-suppressors were carriers of the “*Tth111I* + *BcII*/ Wild” or “*Tth111I* + *ER22/23EK* + *9β*/ Wild” genotypes. SW subjects presented less cortisol suppression compared to SV (p<0.001). Children younger than 10 years presented more cortisol suppression compared to adolescents and adults (p=0.035). SV subjects with GC hypersensitivity-genotypes showed decreased average cortisol levels compared to those with GC resistance-genotypes (p=0.0023). Results did not differ significantly according to gender, GC class and dose, body mass index or oral contraceptive use. **Conclusion:** The *Tth111I* + *9β*/ Wild or *Tth111I* + *ER22/23EK* + *9β*/ Wild genotypes were associated to GC resistance in this population. This finding may be relevant given the challenges posed by therapeutic management with GC in CAH.

Keywords: Glucocorticoid receptor gene polymorphism; Pharmacogenetics; Congenital Adrenal Hyperplasia; Dexamethasone intravenous dexamethasone suppression test.

Many drugs commonly used in clinical settings are prescribed in a “one size fits all” manner, however they function differently across patients. This pattern holds in the case of glucocorticoids (GCs), one of the most widely prescribed classes of drugs used as anti-inflammatory agents to control both acute and chronic inflammation. GC long-term replacement is also used for Congenital Adrenal Hyperplasia treatment (CAH).

The diversity in GC response varies widely in the healthy population. In organs and tissues, GCs act mainly through the glucocorticoid receptor (GR). Transient changes in receptor sensitivity in peripheral targets may occur in infectious diseases, neoplasms, acquired immunodeficiency syndrome and autoimmune disorders.¹ Previous studies of the GR function within a CAH population regarding the number of the receptors and its binding affinity showed no significant differences compared to healthy controls.² Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the GR gene, *NR3C1*³, have been associated with changes in GC sensitivity^{4,5}.

GR is an intracellular transcription factor encoded by the *NR3C1* (*Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1*) gene. Some of the most studied GR polymorphisms are predictably inherited in haplotypes, whose arrangements could lead to a wide spectrum of the GC response in CAH subjects, with higher or lower sensitivity profiles.^{4,5} Haplotype-phenotype correlations for the polymorphisms *Tth1111*, *ER22*, *23EK*, *N363S*, *BcII* and *9β* were explored across various cohorts of children and adults on GC treatment for Cystic Fibrosis⁶, Bowel Inflammatory Disease⁷, Psoriasis⁸, Multiple Sclerosis⁹; and in Cushing's¹⁰, metabolic¹¹ and Guillain Barré¹² syndromes. GR gene polymorphisms have been also associated with metabolic parameters and mental disorders^{13,14}.

Dexamethasone is a highly selective agonist for GR. The dexamethasone suppression test (DST) is widely used to evaluate the GC negative feedback. After dexamethasone intake, cortisol is typically suppressed. Low dexamethasone doses, such as those used in DST, are largely excluded from the brain by the multidrug-resistant pump. Thus, the DST primarily assess the GC negative feedback at the level of the anterior pituitary.¹⁵

As opposed to the 1 mg DST, commonly used to rule out endogenous Cushing's syndrome, the very low-dose DST (VLD-DST) only partially suppresses cortisol levels and was developed to assess individual GC sensitivity.¹⁶

Pharmacogenomics may play a role in predicting response to GC treatment and prevent long-term side effects. Given this evidence, the purpose of the present study was to investigate whether the most frequent GR gene polymorphisms are associated to different GC response in a cohort of CAH subjects.

Methods

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. All of the children, adolescents and legal guardians signed an informed written consent after receiving information concerning the study.

Preliminary Genotype Estimation

The human GR gene (*NR3C1*) is located within a single linkage disequilibrium block in chromosome 5 (5q31.3)¹⁷. It spans a length of 157,582 bases and is comprised of 13 first non-coding exons, which act as alternative promoters, and 8 protein-coding regions or exons (numbered 2-9). There are several SNPs of this gene and some of the most relevant ones, which are *Tth1111*, *ER22*, *23EK*, *N363S*, *BcII* and *9β* (rs10052957, rs6189, rs6190, rs56149945, rs41423247, rs6198) were investigated for 21-OHD-CL subjects (n=102) in a preliminary analysis (data not showed).

Thirty-four subjects had genotypes eligible for the present study, which means that they were determined with 100% of certainty and were related only to GC hypersensitivity or resistance profiles, according to well-established data in the literature^{4,5}. Subjects' genotypes were estimated computationally by the Haplo.stats package (1.6.3 version), available in R, 3.5.1 version. The software used a maximum likelihood estimation algorithm (*haplo.em* function) and calculated specific values for the haplotypes (*haplo.score* function), considering $p < 0.05$, and further estimates carrier probability assuming a diallelic model of inheritance.

Subjects

Out of 34 subjects, 28 accepted to participate and were in good health to undergo the VLD-DST. Twenty-one females (75%) and 7 males (25%) aged 12 (2-34) were enrolled in this study. They attended the UFMG endocrinology care center and were under regular treatment for classical 21-hydroxylase deficiency (21-OHD-CL).

All subjects were receiving oral hydrocortisone, prednisone or dexamethasone. Most of them, 21 (75%), presented the salt-wasting (SW) form, of which 16 (76%) were receiving fludrocortisone for mineralocorticoid replacement; 7 presented the simple virilizing (SV) form. Clinical and biochemical evaluation provided the basis for the 21-OHD diagnosis and all girls reported ambiguous genitalia at birth. No participant had another chronic illness or took medication other than hormone replacement therapy for 21-OHD and oral contraceptives.

Very low-dose dexamethasone test (VLD-DST)

Subjects were invited to participate in the study by phone. After consent, current information was obtained regarding continuous-use medication, such as mineralocorticoid, oral contraceptives and GC. They underwent the test when serum 17-hydroxyprogesterone (17OHP), measured by an available chemiluminescence assay, was > 1000 ng/dL on the eve of the test, suggesting no suppression of the hypothalamic-pituitary axis¹⁸. The GC was discontinued for the test and the withdrawal time was 4 days for hydrocortisone, 6 days for prednisone and 7 days for dexamethasone, taking into account the biological half-life of each drug (hydrocortisone 12-36 hours, prednisone 18-36 hours and dexamethasone 36-54 hours)¹⁹. After GC withdrawal, participants were carefully monitored by phone. They did not discontinue the use of fludrocortisone and oral contraceptives.

The test was carried out at UFMG Laboratory Medical Service, from October 2018 to August 2019. Standard anthropometric measurements were obtained by a single trained observer with the patients wearing appropriate clothes; body mass index (BMI) was calculated by $[\text{weight (kg)}/\text{height (m)}^2]$ and body surface area (BSA) was calculated by $[\text{weight (kg)} \times 4 + 7/90 + \text{weight (kg)}]$.²⁰⁻²¹

The test was planned according to previous standardization, with baseline serum cortisol measurements at 8:00 am and 2 hours after intravenous dexamethasone disodium phosphate (Decadron® 2mg/mL, Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., Brazil). The solution was prepared according to the protocol: 1 mL of the product diluted in 19 mL of 0.9% saline solution to a final concentration of 100 µg/mL. The dexamethasone dose was calculated according to BSA.²² After a pilot study the decision was made to extend the functional test with a second administration of double dose dexamethasone and collect a new serum cortisol sample 2 hours later. The final protocol was established as follows:

- 1) Serum cortisol at baseline (at 8:00 am)
- 2) Intravenous dexamethasone infusion (20 µg/m²)
- 3) Serum cortisol after 2 hours
- 4) Intravenous dexamethasone infusion (40 µg/m²)
- 5) Serum cortisol after 2 hours (4 hours from baseline)

Serum Cortisol Assessment

Blood samples were collected at UFMG Laboratory Medical Service and analyzed in the same institution for serum cortisol, measured by a competitive chemiluminescent enzyme immunoassay on the Integrated VITROS™ 5600 MicroWell platform (Johnson & Johnson, High Wycombe, UK, 2009). The manufacturer's range for serum basal cortisol is 4.46–22.7 µg/dL. The provided detection limit (sensitivity) is > 0.1 µg/dl and the working range is 0.16–61.6 µg/dL. The cortisol mean cross-reactivity with biological steroid precursors is < 0.5%. The 20 µg/m²-DST intraindividual cortisol variability was 4.3% in a previous study²².

Statistical Analysis

Baseline and suppressed serum cortisol (F) values were evaluated together as a continuous variable (average cortisol values) and as a percentage change²²: $F1\% = 100 - (F_{\text{hours}} \times 100 / F_{\text{basal}})$; and $F2\% = 100 - (F_{4 \text{ hours}} \times 100) / F_{2 \text{ hours}}$. Any percentage reduction was considered a relevant suppressive response for the analysis.

The primary variable of interest was the subjects' genotypes. Other variables studied were age, gender, BMI, baseline cortisol, 21-OHD-CL-SW/SV forms, fludrocortisone, oral contraceptive use and GC class and dose. For uniform analysis, long-acting GC were transformed into equivalent doses of hydrocortisone, as follows: hydrocortisone 1 mg = prednisone 4 mg = dexamethasone 30 mg¹⁹. Age was studied as a categorical variable: <10, 10-20 and > 20 years old.

Outlier evaluation of F1% and F2% values followed the limit of 1.5 times the interquartile range (IQR).

The non-parametric Kruskal-Wallis (KW) test was used to compare medians. The significance was taken at the $p < 0.10$ considering the sample size.

Multiple regression models were performed for F1% and F% results, using the backward stepwise regression method, beginning with all covariates and iteratively removing the variable with the highest *p-value* until the remaining variables in the model are statistically significant ($p < 0.05$).

Multiple regression analysis was performed using a random effect model for average cortisol values. The significance was taken at the $p < 0.05$.

The analysis was performed using R (version 3.6.1, Core Team, 2019), Minitab Statistical (version 17.1.0, 2010) and Microsoft® Excel for Mac (version 16.32, 2019) Software.

Results

Subjects clinical features are summarized in **table 1** and their genotype distribution in **table 2**.

Table 1. Clinical characteristics of 21-OHD-CL subjects (n=28)

Characteristics	n (%)
Age-groups (full years old) *	
<10	9 (32%)
10-20	9 (32%)
>20	10 (36%)
Gender	
Female	21 (75%)
Male	7 (25%)
21-OHD classical form	
Salt-wasting	21 (75%) (4 children, 7 adolescents, 9 adults)
Simple virilizing	7 (25%) (4 children, 2 adolescents, 1 adult)
Fludrocortisone use	
Salt-wasting	16/21 (76%)
Simple virilizing	0
Long-term GC (type)	
Hydrocortisone	16 (57%) (10 children, 6 adolescents)
Prednisone	9 (32%) (2 adolescents, 7 adults)
Dexamethasone	3 (11%) (all adults)
Long-term GC (dose in mg/m²) **	
Median	11.5
IQR	8-12.5
BMI status	
Eutrophic	15 (54%)
Overweight or obese	13 (46%)
Oral Contraceptive use (women)	
Yes	5 (18%)
No	16 (57%)

*<10: children, 10-20: adolescents, >20: adults

** hydrocortisone-equivalent dosing

21-OHD: 21-hydroxylase deficiency; GC: glucocorticoid; IQR: interquartile range; BMI: body mass index

Table 2. Genotypes according to GC resistance or increased sensitivity in 28 21-OHD-CL subjects

GC resistance	n
<i>Tth111I + 9β / Wild</i>	15
<i>Tth111I + 9β / Tth111I + ER22/23EK + 9β</i>	1
<i>Tth111V / Tth111I + ER22/23EK + 9β</i>	1
<i>Tth111I + ER22/23EK + 9β / Wild</i>	1
GC increased sensitivity	n
<i>Wild / BclI</i>	7
<i>BclI / BclI</i>	2
<i>Wild / N363S</i>	1

21-OHD-CL: classical form of 21-hydroxylase deficiency; GC: glucocorticoid

Out of eleven participants enrolled in the pilot study, five presented dexamethasone cortisol suppressed levels.

Twenty-two subjects underwent the extended test: six participants presented dexamethasone cortisol suppressed levels after 2-hours testing and nine presented only after 4-hours testing; seven participants had no cortisol suppression at all.

An outlier for F1% and F2% results was excluded from analysis, the data was from a non-suppressor-male-SW participant younger than 10 years old, who was receiving hydrocortisone and fludrocortisone. His genotype was *Wild / N363S*.

F1% and F2% results are described in **table 3**.

Table 3. Changes in cortisol values across the dexamethasone test (F1% and F2% results) of 21-OHD subjects

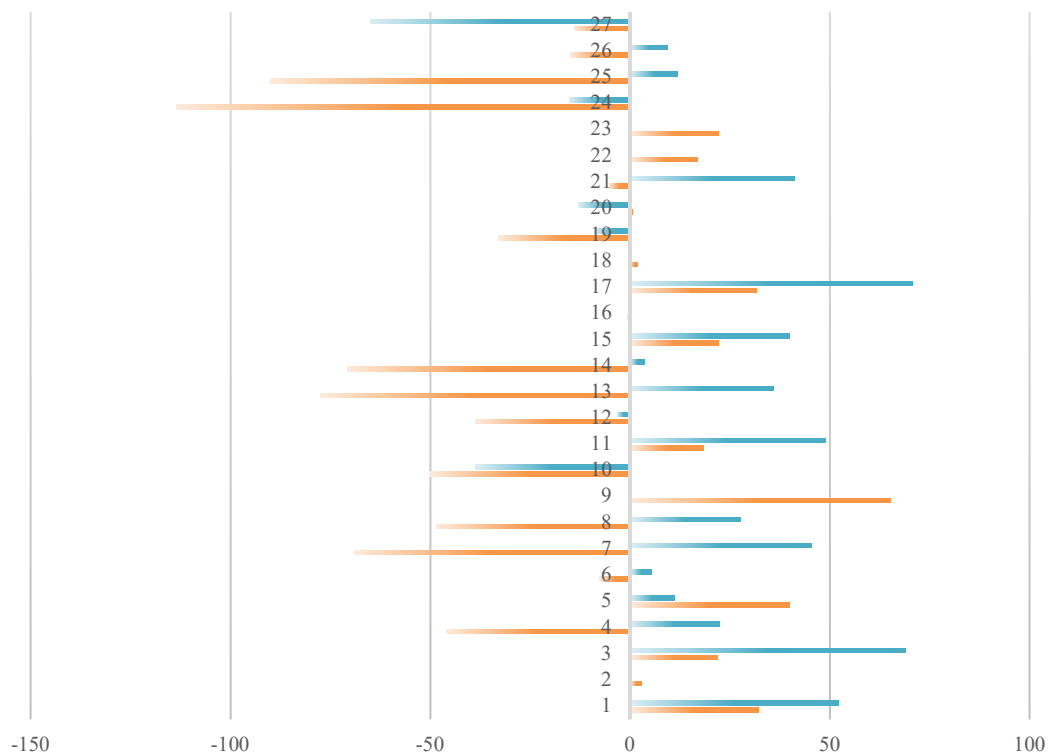
Percentage changes in cortisol values	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
F1% * (n=27)	- 113.46%	- 48.54%	- 5.42%	+ 21.83%	+ 65.20%
F2% ** (n=21)	- 64.91%	- 6.09%	+ 12.01%	+ 43.32%	+ 70.64%

*F1%= 100 - (F_{2 hours} X 100/F_{basal})

**F2%= 100 - (F_{4 hours} X 100)/F_{2 hours})

21-OHD: 21-hydroxylase; Q: quartile

Graphs in **figure 1** indicate a more homogeneous response among subjects after the second dexamethasone dose and more positive F2% results compared to F1%'s.



$$F1\% = 100 - (F_{2 \text{ hours}} \times 100 / F_{\text{basal}})$$

$$F2\% = 100 - (F_{4 \text{ hours}} \times 100) / F_{2 \text{ hours}}$$

Positive values: serum cortisol levels decreased after the dexamethasone infusion/ Negative values: serum cortisol levels increased despite the dexamethasone infusion

21-OHD: 21-hydroxylase

Figure 1. Distributions of F1% (n=27) in orange and F2% (n=21) in blue for 21-OHD subjects

SW subjects presented less cortisol suppression compared to SV form (**table 4**). **Figure 2** shows no significant differences for F1% results ($p=0.121$, KW), while wide differences were seen between the groups ($p<0.001$, KW) for F2%.

F2% results were studied between SV and SW fludrocortisone non-users and significant differences remained ($p=0.0388$, KW) as seen in **figure 3**.

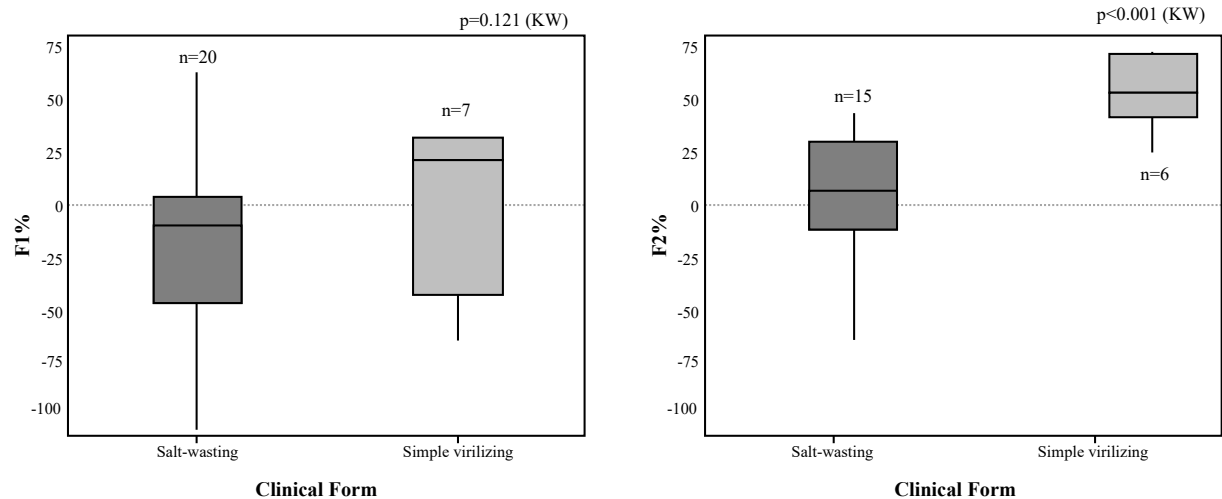
Table 4. Changes in cortisol values across the dexamethasone test (F1% and F2% results) of 21-OHD-subjects according to their clinical form (n=27)

Percentage changes in cortisol values					
F1%*	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
Simple virilizing (n=7)	- 69.1	- 46	+ 21.7	+ 31.6	+ 32.2
Salt-wasting (n=20)	- 113.46	- 49.81	- 10.94	+ 2.6	+ 65.2
F2%**	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
Simple virilizing (n=6)	+ 22.37	+ 39.73	+ 50.67	+ 69.35	+ 70.64
Salt-wasting (n=15)	- 64.91	- 12.98	+ 5.41	+ 69.35	+ 41.12

*F1%= $100 - (F_2 \text{ hours} \times 100 / F_{\text{basal}})$

**F2%= $100 - (F_4 \text{ hours} \times 100) / F_2 \text{ hours}$

21-OHD: 21-hydroxylase; Q: quartile

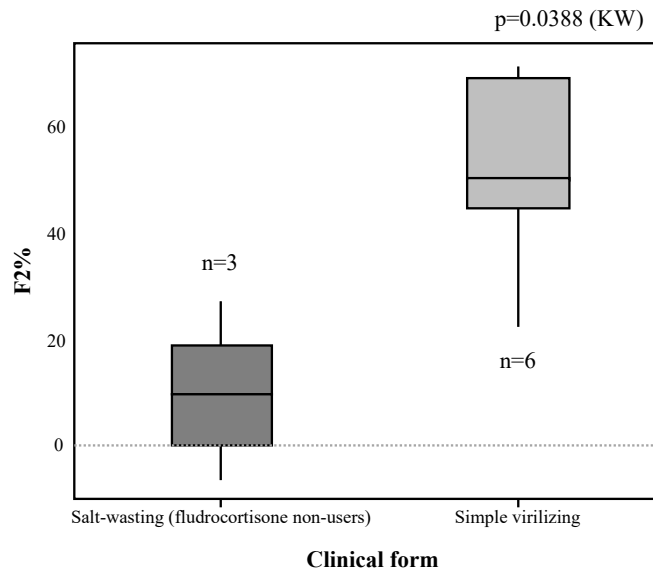


F1%= $100 - (F_2 \text{ hours} \times 100 / F_{\text{basal}})$

F2%= $100 - (F_4 \text{ hours} \times 100) / F_2 \text{ hours}$

21-OHD: 21-hydroxylase

Figure 2. Distribution of F1% and F2% results of 21-OHD-subjects according to their clinical form (n=27)

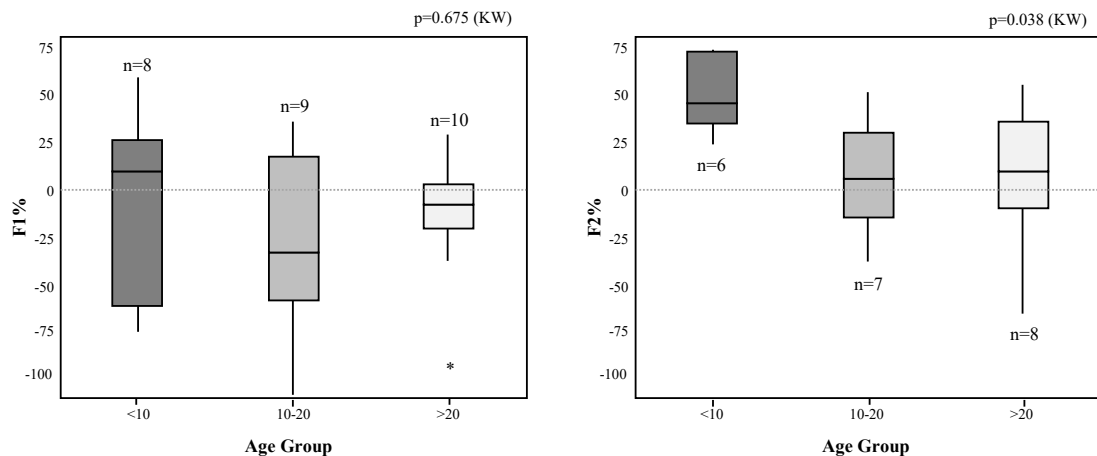


$$F2\% = 100 - (F_{4 \text{ hours}} \times 100) / F_{2 \text{ hours}}$$

21-OHD: 21-hydroxylase

Figure 3. Distribution of F2% results of simple-virilizing subjects and salt-wasting fludrocortisone non-users (n=9)

Figure 4 shows no significant differences in F1% results between children, adolescents or adults (p=0.675, KW); while for F2% results, children had more cortisol suppression compared to adolescents and adults (p=0.035, KW).



$$F1\% = 100 - (F_{2 \text{ hours}} \times 100 / F_{\text{basal}})$$

$$F2\% = 100 - (F_{4 \text{ hours}} \times 100) / F_{2 \text{ hours}}$$

21-OHD: 21-hydroxylase

Figure 4. Distribution of F1% and F2% results of 21-OHD-subjects categorized by age: <10, 10-20 and >20 years old (n=27)

The clinical variables gender, glucocorticoid use (type and dose), BMI, and oral contraceptive use did not impact F1% or F2% results.

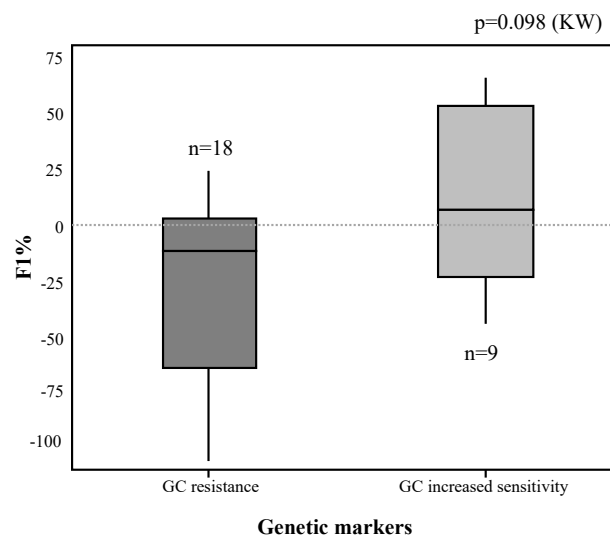
The genetic markers did not significantly impact F1% ($p=0.217$, KW) and F2% ($p=0.101$, KW) results. **Table 5** shows that all DST non-suppressors presented GC resistance-genotypes. The most significant cortisol suppression was observed in a homozygous *BcII*-carrier.

Table 5. Pharmacogenomic markers of glucocorticoid resistance in 21-OHD subjects (n=6)

Genotype	DST non-suppressors subjects
<i>Tth111I</i> + <i>9β</i> / <i>W</i>	5 (83%)
<i>Tth111I</i> + <i>ER22/23EK</i> + <i>9β</i> / <i>W</i>	1 (17%)

21-OHD: 21-hydroxylase deficiency; DST: dexamethasone suppression test; W: wild

SW subjects with genetic markers of GC resistance presented less cortisol suppression until the 2-hour mark of the test, compared to SW subjects with GC increased sensitivity markers ($p=0.098$, KW), as seen in **figure 5**.



*F1%= $100 - (F2_{\text{hours}} \times 100 / F_{\text{basal}})$

21-OHD: 21-hydroxylase deficiency; GC: glucocorticoid

Figure 5. Distribution of F1% results categorized by genetic markers of 21-OHD-subjects (n=27)

All non-suppressors were SW subjects with median 17OHP of 3448 ng/dL (ranging 1443 to 10,000 ng/dL) on the eve of the challenge test.

In the multivariate analysis, two linear regressions models were fitted, one for each result, F1% and F2%. **Table 6** shows that baseline cortisol was the only statistically significant variable towards F1% results ($p=0.036$). The higher the cortisol concentration at baseline was, the more it decreased towards the 2-hour mark of the test, and an increase in baseline cortisol concentrations in 1 $\mu\text{g}/\text{dL}$ implied an increase of 3.25% in F1%.

Table 6. Multivariate analysis for F1% results of 21-OHD-subjects (n=27)

	Coefficient	<i>p-value</i>
Constant	-56.9	0.010
Baseline cortisol ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	+3.25	0.036

(Equation: $-56.9 + 3.25 \text{ baseline cortisol} = \text{F1\%}$)

$\text{F1\%} = 100 - (\text{F}_{2 \text{ hours}} \times 100 / \text{F}_{\text{basal}})$

21-OHD: 21-hydroxylase deficiency

The final model for F2% results included the clinical variables: baseline cortisol ($p=0.008$), age ($p=0.037$) and clinical form ($p=0.048$) (**table 7**). The higher the cortisol concentration at baseline was, the more it decreased towards the 4-hour test, and an increase in baseline cortisol concentrations in 1 $\mu\text{g}/\text{dL}$ implied an increase of 2.928% in F2%. The younger the subject was, the higher the cortisol suppression, and a decrease in age by one year implied an increase of 1.319% in F2%. SV subjects presented an increase of 26.8% in F2%, compared to SW.

Table 7. Multivariate analysis for F2% results of 21-OHD-subjects (n=21)

	Coefficient	<i>p-value</i>	VIF
Constant	-8.4	0.561	
Baseline cortisol ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	+2.928	0.008	1.22
Age	-1.319	0.037	1.29
Simple virilizing form	+26.8	0.048	1.42

(Equation: $-8.4 + 26.8 \text{ SV} + 2.928 \text{ baseline cortisol} = \text{F2\%} - 1.319 \text{ age}$)

$\text{F2\%} = 100 - (\text{F}_{4 \text{ hours}} \times 100) / \text{F}_{2 \text{ hours}}$

21-OHD: 21-hydroxylase deficiency; SV: simple virilizing; VIF: variance inflation factor

Two time-effect models were built to study the average cortisol levels across the test compared to baseline in SV and SW subjects. The variables genotype, age and fludrocortisone-use were included.

SV subjects presented a statistically significant decrease in cortisol levels towards the 4-hour mark of the test ($p=0.0064$). The final multivariate model included the age ($p=0.0155$) and genotype ($p=0.0023$) variables (**table 8**). A decrease in age by 1 year implied an increase of $0.3 \mu\text{g/dL}$ in average cortisol levels amongst SV. Subjects with GC hypersensitivity-genotypes showed a decrease of $7.3 \mu\text{g/dL}$ in average cortisol levels, compared to those with GC resistance-genotypes.

Table 8. Multivariate analysis for average cortisol compared to baseline levels of simple virilizing-21-OHD-subjects ($n=7$)

Fixed effects	Coefficient	<i>p-value</i>
Factor (2-hour mark)	-0.88	0.674
Factor (4-hour mark)	-8.88	0.0064
Age	-0.3	0.0155
GC increased sensitivity-genotype	+7.3	0.0023

21-OHD: 21-hydroxylase deficiency; GC: glucocorticoid

Most of SW subjects did not present a statistically significant decrease in cortisol levels towards the 4-hour marks of the test. The genotype did not influence average cortisol concentrations among SW ($p=0.4872$). The final multivariate model included the age ($p=0.011$) and fludrocortisone-use ($p=0.0086$) variables (**table 9**). A decrease in age by 1 year amongst SW implied a decrease of $0.22 \mu\text{g/dL}$ in average cortisol levels. Fludrocortisone users presented average cortisol concentrations $5.3 \mu\text{g/dL}$ higher than non-users.

Baseline cortisol concentrations were not statistically different between SV and SW ($p=0.3326$, KW), nor between SW fludrocortisone non-users and SV subjects ($p=0.416$, KW). However, they were lower amongst SW fludrocortisone users compared to SW non-users ($p=0.088$, KW).

Baseline cortisol concentrations were lower amongst non-suppressors, compared to suppressors ($p<0.003912$, KW).

Baseline cortisol concentrations were not statistically different between children, adolescents and adults.

Table 9. Multivariate analysis for average cortisol compared to baseline levels of salt-wasting -21-OHD-subjects (n=20)

Fixed effects	Coefficient	<i>p</i>-value
Factor (2-hour mark)	+1.64	0.2228
Factor (4-hour mark)	+0.617	0.7270
Age	+0.22	0.011
Fludrocortisone users	+5.3	0.0086

21-OHD: 21-hydroxylase deficiency

Discussion

Herein, pharmacogenomic markers of the GC response were determined for a CAH population. Subjects carrying the GR genotypes *Tth111I + 9β/ Wild* and *Tth111I + ER22/23EK + 9β/ Wild* showed an impaired-DST response compared to both *BcII/ Wild* and *BcII/ BcII*-carriers. *BcII* in homozygosity seemed to potentialize the GR response amongst carriers. In the literature, the *BcII*-variant has been commonly associated with clinical features of increased GC sensitivity, while the *Tth111I*, *ER22/23EK* and *9β* associated with GC resistance.^{4,5}

The variability of the GC sensitivity is determined by several factors, such as the intracellular concentration of GCs, GR expression levels, GR-protein interactions and heterodimerization of the GR- α /GR- β isoforms.²³ GCs are essential for maintaining homeostasis and regulate a wide variety of physiological processes. GR genetic factors associated with GC diversity have been shown to affect not only response to therapy but also disease pathophysiology. GCs play an important role in determining body composition, lipid metabolism, and insulin sensitivity and, as a consequence, influence the risk of cardiovascular disease. GC diversity have been also associated with the development of stress-related disorders.^{4,5,7}

In a previous study, *ER22/23EK*-carriers presented lower body weight, lower total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol levels, as well as lower fasting insulin concentrations and better insulin sensitivity. Conversely, the *BcII*-polymorphism was associated with increased abdominal obesity in middle-aged subjects, while at older age, a lower BMI was found accompanied by lower lean body mass. The *N363S* polymorphism has been associated with increased sensitivity to GCs, increased response to dexamethasone, a tendency towards lower bone mineral density and increased BMI.²⁴

The GR polymorphisms contribute to differences in hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activity by affecting mainly the expression of molecular properties of the receptor protein. The 9β -polymorphism is located in the exon-9 of the gene, which encodes two alternative splicing variants: the α and β isoforms. The polymorphism is associated with increased mRNA expression and stabilization of the dominant-negative splice β -variant. Although the isoforms are 94% identical, the α is the only one capable of binding to GCs to activate gene transcription. Therefore, 9β -variant carriers present a clinical phenotype consistent with the effects of reduced GC sensitivity.²⁵ In a previous study, 9β -carriers with Cushing's syndrome presented a protective effect associated to the minor allele: subjects had a milder hypercortisolism and decreased risk of diabetes and cardiovascular complications¹⁰. The 9β -variant was associated with poor treatment outcome in patients with nephrotic syndrome²⁶. In healthy subjects, it has been described as a protective effect regarding the immune system²⁷.

The *ER22/23K* polymorphisms are located in codons 22 and 23 at the transactivation domain of the exon 2. Both correlate with reduced transactivation in carriers. However, mechanisms on transrepression are also described, suggesting other indirect actions that are not clearly associated with these polymorphisms. Molecular studies point to a 15% increase in the proportion of the GR α -A translation sub-isoform to GR α -B, which seems to be associated with increased GC resistance. These polymorphisms were associated with sex-specific beneficial body composition at young-adult age, as well as greater muscle strength in males.²⁸⁻³⁰

The *Tth1111* and *BcII* variants are located out of protein-coding regions. *Tth1111* is located near the distal promoter region of the GR gene and *BcII* is located between exons 2 and 3. Introns could have important regulatory roles, modifying the expression of mRNA of nearby genes, affecting RNA stability or access of transcription factors to gene regulatory elements³¹. However, the mechanisms by which these polymorphisms affect GC sensitivity remain unclear. *BcII*-variant is associated with increased body fat and higher cardiovascular risk and more cortisol suppression in a DST (0.25 and 1 mg). Several psychiatric disorders in childhood and adolescence and major depression in adults occur more frequently among *BcII*-carriers.³³⁻³⁸

The haplotype-*BcII* was related to clinical features of GC increased sensitivity and positive outcomes in Guillain-Barré syndrome, Psoriasis, Multiple Sclerosis and Rheumatoid Arthritis^{8,9,12,39}. But on the other hand, it was correlated to a predisposition to Asthma, Chronic Obstructive Pulmonary Disease and declined lung function in Cystic Fibrosis. *BcII*-homozygotes presented a five-fold higher risk of asthma than non-carriers.^{6,40}

Heterozygous-*Tth1111* occurred more commonly amongst CAH-subjects while heterozygous-*BcII* was more common amongst healthy controls (data not published). One could hypothesize that maybe *Tth1111*-variant is relevant for the GC response in CAH subjects³².

Regarding the CAH population, there are no reports on GR haplotype structure and few reports on GR isolated polymorphisms in the main databases. Besides, these studies focused on clinical and metabolic features rather than the GC response to treatment. *BcII*-variant was found to play a role in obesity in adults and the *9β*-variant could be involved with susceptibility to an adverse lipid profile in children and adolescents. The *N363S*-variant was associated with milder genital virilization and less obesity.⁴¹⁻⁴³

In our series, we have identified two genotypes as pharmacogenomic markers of the GC resistance (*Tth1111* + *9β/ Wild* and *Tth1111* + *ER22/23EK* + *9β/ Wild*). If future analysis confirms these findings, it could provide the opportunity to individualize the GC replacement-therapy of CAH patients.

The GC response to the DST was associated with subjects' clinical form and age. SV subjects presented more cortisol suppression compared to SW ones. The disease itself may explain this finding: SW subjects present less residual enzymatic activity compared to SV. Their blunt cortisol secretion probably led to greater hypothalamic-pituitary activation through genomic signaling, after GC withdrawal. Therefore, we may hypothesize that the previous hyperactive-state of the HPA-axis hampered the dexamethasone fast feedback inhibition across the test¹⁵. Baseline cortisol concentrations also reflected the subjects' clinical form and salt-wasting differences.

Children younger than 10 years old presented more cortisol suppression during the 4-hour test, compared to adolescents and adults. However, this children-group brought together the highest proportion of SV subjects, which may explain this finding, once SV presented more cortisol suppression.

There is a concern with long-term treatment with GC, but the idea that the adverse effects are due exclusively to its increased circulating levels is controversial. And nowadays, there is a greater focus on the study of GC sensitivity as an important predictive factor of treatment response.²³ Physicians widely recognize the challenges posed by therapeutic management of CAH patients. Some clinical features of GC resistance are observed in practice while monitoring these patients. In the present study, six SW participants with GC resistance-genotypes did not present any cortisol suppression in the DST and their baseline cortisol concentrations were significantly lower than non-suppressors. Altogether, these results suggest that these subjects may need higher GC doses.

The presented study has a few limitations that arise from a relatively small sample.

In conclusion, the *Tth111I + 9β/ Wild* and *Tth111I + ER22/23EK + 9β/ Wild* genotypes were pharmacogenomics markers of GC resistance in CAH. These findings may be relevant given the challenges posed by the therapeutic management with GC in CAH.

Acknowledgements

This study was partially supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico, Brazil) and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil).

Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest.

References

1. Barnes PJ, Adcock IM, Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet*.2009;373(9678):1905-17.
2. Saka N, Güven M, Bas F, Darendeliler F, Bundak R, Günöz H, et al. Glucocorticoid receptors in patients with congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Endocrinol Metab*.2000;13(8):1101-7.
3. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, et al. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*. 1985;318(6047):635-41.
4. Manenschijn L, van den Akker EL, Lamberts SW, van Rossum EF. Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms an overview. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;179-198.
5. Koper JW, van Rossum EF, van den Akker EL. Glucocorticoid receptor polymorphism and haplotypes and their expression in health and disease. *Steroids* 2014; 92:62-73.
6. Corvol H, Nathan N, Charlier C, Chadelat K, Le Rouzic P, Tabary O, et al. Glucocorticoid receptor gene polymorphisms associated with progression on lung disease in young patients with cystic fibrosis. *Resp Res*.2007; 29:8-88.
7. Wwinyi J, Wenger C, Elorata JJ, Kullak-Ublick GA. Glucocorticoid receptor gene haplotype structure and steroid therapy outcome in IBD patients. *World J Gastroenterol*.2010;16(31):3888-96.

8. Stevens A, Ray DW, Zeggini E, John S, Richards HL, Griffiths CE, et al. Glucocorticoid sensitivity is determined by a specific glucocorticoid receptor haplotype. *Clin Endocrinol Metab.*2004;89(2):892-7.
9. Van Winsen LM, Manenschijn L, van Rossum EF, Crusius JB, Joper JW, Polman CH, et al. A glucocorticoid receptor gene haplotype (*Tth1111/ER22/23EK/9beta*) is associated with a more aggressive disease course in multiple sclerosis. *J Clin Endocrinol Metab.*2009;94(6):2110-4.
10. Trementino L, Appolloni G, Concettoni C, Cardinaletti, Boscaro M, Arnaldi G. Association of glucocorticoid receptor polymorphism *A3669G* with decreases risk of developing diabetes in patients with Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol.*2012;166(1):35-42.
11. Wester VL, Koper JW, van den Akker EL, Franco OH, Stolk RP, van Rossum EF, et al. Glucocorticoid receptor haplotype and metabolic syndrome: Lifelines cohort study. *Eur J Endocrinol.*2016;175(6):645-51.
12. Dekker MJ, vand der Akker EL, Koper JW, Manenshiin L, Geleijns K, Ruts L, et al. Effect of glucocorticoid receptor gene polymorphisms in Guillain-Barré syndrome. *J Peripher Nerv Syst.*2009;14(2):75-83.
13. Derijk RH, de Kloet ER. Corticosteroid receptor polymorphisms; determinants of vulnerability and resilience. *EUR J Pharmacol.* 2008;583(2-3):303-11.
14. Schote AB, Bonenberger M, Pálmason H, Seitz C, Meyer J, Freitag CM. Glucocorticoid receptor variants in childhood attention-deficit/hyperactivity and comorbid psychiatric disorders. *Psychiatry Res.* 2016;275-83.
15. Spencer RL, Deak T. A user's guide HPA axis research. *Physiol Behav.*2017;178:43-65.
16. Golden SH, Wand GS, Malhotra S, Kamel I, Horton K. Reliability of hypothalamic-pituitary-adrenal axis assessment methods for use in population-based studies. *Eur J Epidemiol.*26(7):511-25.
17. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, et al. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature.* 1985;318(6047):635-41.
18. Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, Baskin LS, Conway GS, Merke DP, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: as Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.*2018;103(11):4043-4088.
19. Sperling MA. *Endocrinologia Pediátrica*. [Salles AD, et al, trad]. 4ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.

20. Furqan M, Haque A. Surface area in children: a simple formula. *Indian Pediatr.* 2009;46(12):1085-1087.
21. World Health Organization. Child Growth Standards. Methods and development. Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age. Geneva: WHO; 2006.
22. Faria CD, Cobra JF, Silva TS, Melo MR, Rocha MN, Longui CA, et al. A very low dose intravenous dexamethasone suppression test as an index of glucocorticoid sensitivity. *Horm Res.* 2008;69(6):357-362.
23. Rodriguez JM, Alvarez MM, Henriquez S, Llanos MN, Troncoso R. Glucocorticoid resistance in chronic diseases. *Steroids.* 2016;115:182-192.
24. Van Rossum EF, Lamberts SW. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res.* 2004;59: 333-57.
25. Derijk RH, Shaaf MJ, Turner G, Datson NA, Vreugdenhil E, Cidlowjki J, et al. A human glucocorticoid receptor gene variant that increase the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2001;28(11):2383-8.
26. Teeninga N, Kist-van Holthe JE, van den Akker EL, Kersten MC, Boersma E, Krabbe HG, et al. Genetic and in vivo determinants of glucocorticoid sensitivity in relation to clinical outcome of childhood nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 2014;85(6):1444-53.
27. Van den Akker EL, Russcher H, van Rossum EF, Brinkmann AO, de Jong FH, Hokken A, et al. Glucocorticoid receptor polymorphism affects transrepression but not transactivation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(7):2800-3.
28. Russcher H, van Rossum EF, de Jong FH, Brinkmann AO, Lamberts SW, Koper JW. Increased expression of the glucocorticoid receptor-A translational isoform as a result of the *ER22/23EK* polymorphism. *Mol Endocrinol.* 2005;19(7):1687-96.
29. van Rossum EF, Roks PH, de Jong FH, Brinkmann AO, Pols HA, Koper JW, et al. Characterization of a promoter polymorphism in the glucocorticoid receptor gene and its relationship to three other polymorphisms. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004;61(5):573-81.
30. Van Rossum, Voorhoeve PG, te Velde SJ, Koper JW, Delemarre-van de Waal HA, Kemper HC, et al. The *ER22/23EK* polymorphism in the glucocorticoid receptor gene is associated with a beneficial body composition and muscle strength in young adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(8):4004-9.

31. Shaul O. How introns enhance gene expression. *Int J Biochem Cell Biol.* 2017;91(Pt B):145-5.
32. Rosmond R, Chagnon YC, Chagnon M, Pérusse L, Bouchard C, Björntorp P. A polymorphism of the 5' flanking region of the glucocorticoid receptor gene locus is associated with basal cortisol secretion in men. *Metabolism.*2000;49(9):1179-9.
33. Geelen CC, van Greevenbroek MM, van Rossum EF, Schaper NC, Nijpels G, et al. *BclI* glucocorticoid receptor polymorphism is associated with greater body fatness: the Hoorn and CODAM studies. *Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(3): E595-9.
34. Giordano R, Marzotti S, Berardelli R, Karamouzis I, Brozzetti A, D'Angelo V, et al. *BclI* polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with increased obesity, impaired glucose metabolism and dyslipidemia in patients with Addison's disease. *Clin Endocrinol (Oxf).*2012;77(6):863-70.
35. Schote AB, Bonenberger M, Palmason H, Seitz C, Meyer J, Freitag CM. Glucocorticoid receptor variants in childhood attention-deficit/hyperactivity disorder and comorbid psychiatric disorders. *Psychiatry Res.* 2016; 30246:275-283.
36. Dmitrzak-Weglarz M, Szczepankiewicz A, Slopian A, Tyszkiewicz M, Maciukiewicz M, Zaremba D. Association of the glucocorticoid receptor gene polymorphism and their interaction with stressful life events in Polish adolescent girls with anorexia nervosa. *Psychiatr Danub.*2016;28(1):51-7.
37. Castellini G, Lelli L, Tedde A, Piaceri I, Bagnoli S, Lucenteforte E, et al. Analyses of the role of the glucocorticoid receptor gene polymorphism (rs41423247) as a potential moderator in the association between childhood overweight, psychopathology, and clinical outcomes in Eating Disorders patients: 6 years follow up study. *Psychiatry Res.* 2016; 243:156-60.
38. Peng Q, Yan H, Wen Y, Lai C, Shi L. Association between *NR3C1* rs41423247 polymorphism and depression: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore).*2018;97(39): e12541.
39. van Oosten MJ, Dolhain RJ, van Rossum EF, Emonts M, Han KH, Wouters JM, et al. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene that modulate glucocorticoid sensitivity are associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.*2010;12(4): R159.
40. Kmyta V, Orlovskvi V, Prystupa L, Prystupa E. *BclI* polymorphism of the glucocorticoid receptor gene and bronchial asthma. *Georgian Med News.* 2015;(240):51-5.

41. Moreira RP, Gomes LG, Madureira G, Mendonça BB, Bachega TA. Influence of the *A3669G* glucocorticoid receptor gene polymorphism on the metabolic profile of pediatric patients with congenital adrenal hyperplasia. *Int J Endocrinol.*2014;2014:594710.
42. Moreira RP, Gomes LG, Mendonça BB, Bachega TA. Impact of glucocorticoid receptor gene polymorphisms on the metabolic profile of adult patients with the classical form of 21-hydroxylase deficiency. *PLoS One.*2012;7(9): e44893.
43. Luczay A, Török D, Ferenczi A, Majnik J, Sólyom J, Fekete G. Potential advantage of *N363S* glucocorticoid receptor polymorphism in 21-hydroxylase deficiency. *Eur J Endocrinol.* 2006;154(6):859-64.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A observação de padrões diferentes de sensibilidade ao GC, relatada anteriormente em outras condições clínicas, foi confirmada em indivíduos com a forma clássica da D-21OH neste estudo. Nossos resultados demonstraram a relação de um quadro de maior resistência a quatro polimorfismos do GR, *Tth111I*, *ER22/23EK*, 9β enquanto o *BcII* se correlacionou à hipersensibilidade ao GC.

O *BcII* foi encontrado com maior frequência nos controles, quando comparados aos indivíduos com a D-21OH.

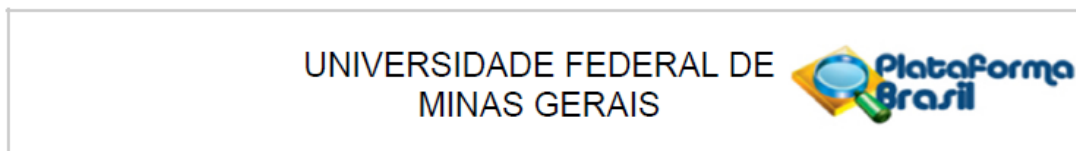
Participantes com maior grau de deficiência enzimática mostraram maior resistência ao GC, o que poderia sugerir a necessidade de abordagem diferenciada para os pacientes. Atualmente, as doses médias de GC preconizadas para reposição na D-21OH são similares para indivíduos com diferentes graus de deficiência enzimática.

A farmacogenômica pode ajudar a prever a sensibilidade e resposta aos GCs em pacientes com a forma clássica da D-21OH. As informações obtidas no presente estudo podem contribuir para a discussão de uma terapia mais individualizada e melhores resultados clínicos em longo prazo.

7 ANEXOS

ANEXO A

Documento de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG)



Continuação do Parecer: 1.172.019

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos favoráveis à aprovação do projeto "Associação entre polimorfismos do gene NR3C1 e a sensibilidade glicocorticoide em uma população de crianças e adolescentes com Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da 21-hidroxilase" da Pesquisadora Profa. Dra. Ivani Novato Silva.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado conforme parecer.

ANEXO B

Termos de consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO AOS PAIS OU RESPONSÁVEIS, SEGUNDO RESOLUÇÃO NÚMERO 466 DE 2012 DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE (DUAS VIAS)
(PARTICIPANTE COM HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA, COM IDADE INFERIOR A 18 ANOS)

A) Informações aos pais ou responsáveis:

Seu filho está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa que estamos realizando sobre a **hiperplasia adrenal congênita**, que é a doença com a qual a criança nasce e que é herdada na família. Como você já sabe, a doença exige o controle com a medicação chamada **acetato de hidrocortisona**. A dose utilizada depende do peso, idade e possivelmente das características dos genes de cada criança. Como a herança familiar desses genes pode ser estudada nas células do sangue, acreditamos que esta pesquisa poderá auxiliar no entendimento da doença e na melhora da orientação para o tratamento no futuro. Iremos estudar então as **possíveis alterações dos genes** e as **ações dos medicamentos nas células do sangue**. O objetivo da pesquisa é **determinar a relação entre a resposta ao medicamento e os genes**. A partir dessa informação, será possível melhorar o tratamento.

Se você concordar que seu filho(a) participe, serão realizados exames laboratoriais. Os riscos relacionados apenas à coleta de sangue são baixos e incluem: desconforto ou dor mínima durante o procedimento, formação de equimose (mancha roxa) transitória, inchaço e infecção locais e flebite (inflamação da veia), mas ela será realizada por técnicos experientes, o que reduz a ocorrência desses problemas. A consulta médica e o exame serão previamente agendados com você. Vocês não terão nenhum custo, nem receberão qualquer vantagem financeira. Quando a pesquisa for finalizada nossa expectativa é que os indivíduos com a **hiperplasia adrenal congênita** possam se beneficiar e seu filho(a) poderá aproveitar da possibilidade de melhora do tratamento com a modificação da dose do medicamento. A participação dele(a) é voluntária e caso você não queira que ele(a) participe, vocês continuarão a receber toda a atenção e o tratamento a que já estão acostumados(a). Você poderá tirar qualquer dúvida que tiver e retirar o consentimento ou desistir da participação a qualquer momento e isso não lhe causará nenhum problema. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos. Os resultados da pesquisa poderão ser divulgados em eventos e periódicos científicos, mas seu filho(a) não será identificado. Vocês serão informados dos resultados da pesquisa quando ela for finalizada.

B) Declaração de termo de consentimento pós-informação:

Declaramos que fomos suficientemente informados a respeito dos objetivos da pesquisa e de sua natureza e concordamos em participar da pesquisa e consentimos que seja realizada a coleta de sangue. Concordo com a participação menor na investigação, e declaro não ter sofrido nenhum tipo de pressão para que isso ocorresse. Por outro lado, estou ciente de que poderei impedir o prosseguimento da mesma, se tiver dúvidas sobre os esclarecimentos que me forem dados, sem prejuízo para o acompanhamento do meu filho(a) pela equipe médica. Recebemos as informações sobre a pesquisa e, depois de ter tirado todas as nossas dúvidas, damos permissão para a coleta.

Nomes e assinaturas:

Nome dos pais ou responsáveis:

Assinaturas:

Local e data: Belo Horizonte, de de 20

Pesquisadores responsáveis:

Dra. Ivani Novato SilvaTelefone: 3409-9773

Dra. Cristina Botelho BarraTelefone: 3409-9773

COEP-UFGM: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II – Campus Pampulha/ UFGM. Belo Horizonte - MG, Brasil.

CEP: 31.270-901/ Telefone: 3409-4592

TERMO DE ASSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO, SEGUNDO RESOLUÇÃO NÚMERO 466 DE 2012 DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, PARA A CRIANÇA E ADOLESCENTE (DUAS VIAS)
(PARTICIPANTE COM HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA, COM IDADE INFERIOR A 18 ANOS)

A) Informação à criança ou adolescente:

Convidamos você a participar como voluntário de uma pesquisa que estamos realizando sobre a **hiperplasia adrenal congênita**, uma doença com a qual a criança nasce e que é herdada na família através dos genes. Como você já sabe, a doença exige o controle com a medicação chamada **acetato de hidrocortisona**. A dose utilizada depende do peso, idade e possivelmente das características dos genes de cada criança. Como a herança familiar desses genes pode ser estudada nas células do sangue, acreditamos que esta pesquisa poderá auxiliar no entendimento da doença e na melhora da orientação para o tratamento no futuro. Iremos estudar então as **possíveis alterações dos genes** e as **ações dos medicamentos nas células do sangue**. O objetivo da pesquisa é **determinar a relação entre a resposta ao medicamento e os genes**. A partir dessa informação, será possível melhorar o tratamento.

Se você concordar em participar, serão realizados exames laboratoriais. Os riscos relacionados à coleta de sangue são baixos e incluem: desconforto ou dor mínima durante o procedimento, formação de equimose (mancha roxa) transitória, inchaço e infecção locais e flebite (inflamação da veia), mas ela será realizada por técnicos experientes, o que reduz a ocorrência desses problemas. A consulta médica e o exame serão previamente agendados com você e seus responsáveis. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Quando a pesquisa for finalizada nossa expectativa é que os indivíduos com a **hiperplasia adrenal congênita** possam se beneficiar e você poderá aproveitar da possibilidade de melhora do tratamento com a modificação da dose do medicamento. Sua participação é voluntária e caso você não queira participar, você continuará a receber toda a atenção e o tratamento a que você já está acostumado(a). Você poderá tirar qualquer dúvida que tiver e retirar o consentimento ou desistir da participação a qualquer momento e isso não lhe causará nenhum problema. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos. Os resultados da pesquisa poderão ser divulgados em eventos e periódicos científicos, mas você não será identificado. Você será informado dos resultados da pesquisa quando ela for finalizada.

Local e data: Belo Horizonte, de de 20

Pesquisadores responsáveis:

Dra. Ivani Novato SilvaTelefone: 3409-9773

Dra. Cristina Botelho BarraTelefone: 3409-9773

COEP-UFMG: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II – Campus Pampulha/ UFMG. Belo Horizonte - MG, Brasil.

CEP: 31.270-901/ Telefone: 3409-4592

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO, SEGUNDO RESOLUÇÃO 466 DE 2012 DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, PARA O ADOLESCENTE (DUAS VIAS)
(PARTICIPANTE COM HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA, COM IDADE ENTRE 18-19 ANOS)

A) Informação ao adolescente:

Convidamos você a participar como voluntário de uma pesquisa que estamos realizando sobre a **hiperplasia adrenal congênita**, que é uma doença com a qual a criança nasce e que é herdada na família. Como você já sabe, a doença exige o controle com a medicação chamada **acetato de hidrocortisona**. A dose utilizada depende do peso, idade e possivelmente das características dos genes de cada um. Como a herança familiar desses genes pode ser estudada nas células do sangue, acreditamos que esta pesquisa poderá auxiliar no entendimento da doença e na melhora da orientação para o tratamento no futuro. Iremos estudar então as **possíveis alterações dos genes** e as **ações dos medicamentos nas células do sangue**. O objetivo da pesquisa é **determinar a relação entre a resposta ao medicamento e os genes**. A partir dessa informação, será possível melhorar o tratamento.

Se você concordar em participar, serão realizados exames laboratoriais. Os riscos relacionados apenas à coleta de sangue são baixos e incluem: desconforto ou dor mínima durante o procedimento, formação de equimose (mancha roxa) transitória, inchaço e infecção locais e flebite (inflamação da veia), mas ela será realizada por técnicos experientes, o que reduz a ocorrência desses problemas. A consulta médica e o exame serão previamente agendados com você. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Quando a pesquisa for finalizada nossa expectativa é que os indivíduos com a **hiperplasia adrenal congênita** possam se beneficiar e você poderá aproveitar da possibilidade de melhora do tratamento com a modificação da dose do medicamento. Sua participação é voluntária e caso você não queira participar, você continuará a receber toda a atenção e o tratamento a que você já está acostumado(a). Você poderá tirar qualquer dúvida que tiver e retirar o consentimento ou desistir da participação a qualquer momento e isso não lhe causará nenhum problema. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos. Os resultados da pesquisa poderão ser divulgados em eventos e periódicos científicos, mas você não será identificado. Você será informado dos resultados da pesquisa quando ela for finalizada.

B) Declaração de termo de consentimento pós-informação:

Declaro que fui suficientemente informado(a) a respeito dos objetivos da pesquisa e de sua natureza. Eu estou de acordo e concordo em participar da pesquisa e consinto que seja realizada a coleta de sangue. Eu,, concordo em participar na investigação e declaro não ter sofrido nenhum tipo de pressão para que isso ocorresse. Por outro lado, estou ciente de que poderei impedir o prosseguimento da mesma, se tiver dúvidas sobre os esclarecimentos que me forem dados, sem prejuízo para o meu acompanhamento pela equipe médica. Recebi as informações sobre a pesquisa e, depois de ter tirado todas as minhas dúvidas, dou permissão para a coleta de sangue.

Nome e assinatura:

Nome do adolescente:

Assinatura:

Local e data: Belo Horizonte, de de 20

Pesquisadores responsáveis:

Dra. Ivani Novato SilvaTelefone: 3409-9773

Dra. Cristina Botelho BarraTelefone: 3409-9773

COEP-UFMG: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II – Campus Pampulha/ UFMG. Belo Horizonte - MG, Brasil.

CEP: 31.270-901/ Telefone: 3409-4592

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO, SEGUNDO RESOLUÇÃO 466 DE 2012 DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, PARA O ADOLESCENTE (DUAS VIAS)
(PARTICIPANTE COM HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA, IDADE SUPERIOR A 19 ANOS)

A) Informação ao participante:

Convidamos você a participar como voluntário de uma pesquisa que estamos realizando sobre a **hiperplasia adrenal congênita**, que é uma doença com a qual a criança nasce e que é herdada na família. Como você já sabe, a doença exige o controle com a medicação chamada **acetato de hidrocortisona**. A dose utilizada depende do peso, idade e possivelmente das características dos genes de cada um. Como a herança familiar desses genes pode ser estudada nas células do sangue, acreditamos que esta pesquisa poderá auxiliar no entendimento da doença e na melhora da orientação para o tratamento no futuro. Iremos estudar então as **possíveis alterações dos genes** e as **ações dos medicamentos nas células do sangue**. O objetivo da pesquisa é **determinar a relação entre a resposta ao medicamento e os genes**. A partir dessa informação, será possível melhorar o tratamento.

Se você concordar em participar, serão realizados exames laboratoriais. Os riscos relacionados apenas à coleta de sangue são baixos e incluem: desconforto ou dor mínima durante o procedimento, formação de equimose (mancha roxa) transitória, inchaço e infecção locais e flebite (inflamação da veia), mas ela será realizada por técnicos experientes, o que reduz a ocorrência desses problemas. A consulta médica e o exame serão previamente agendados com você. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Quando a pesquisa for finalizada nossa expectativa é que os indivíduos com a **hiperplasia adrenal congênita** possam se beneficiar e você poderá aproveitar da possibilidade de melhora do tratamento com a modificação da dose do medicamento. Sua participação é voluntária e caso você não queira participar, você continuará a receber toda a atenção e o tratamento a que você já está acostumado(a). Você poderá tirar qualquer dúvida que tiver e retirar o consentimento ou desistir da participação a qualquer momento e isso não lhe causará nenhum problema. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos. Os resultados da pesquisa poderão ser divulgados em eventos e periódicos científicos, mas você não será identificado. Você será informado dos resultados da pesquisa quando ela for finalizada.

B) Declaração de termo de consentimento pós-informação:

Declaro que fui suficientemente informado(a) a respeito dos objetivos da pesquisa e de sua natureza. Eu estou de acordo e concordo em participar da pesquisa e consinto que seja realizada a coleta de sangue. Eu,, concordo em participar na investigação e declaro não ter sofrido nenhum tipo de pressão para que isso ocorresse. Por outro lado, estou ciente de que poderei impedir o prosseguimento da mesma, se tiver dúvidas sobre os esclarecimentos que me forem dados, sem prejuízo para o meu acompanhamento pela equipe médica. Recebi as informações sobre a pesquisa e, depois de ter tirado todas as minhas dúvidas, dou permissão para a coleta de sangue.

Nome e assinatura:

Nome do participante:

Assinatura:

Local e data: Belo Horizonte, de de 20

Pesquisadores responsáveis:

Dra. Ivani Novato SilvaTelefone: 3409-9773

Dra. Cristina Botelho BarraTelefone: 3409-9773

COEP-UFGM: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II – Campus Pampulha/ UFGM. Belo Horizonte - MG, Brasil.

CEP: 31.270-901/ Telefone: 3409-4592