

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**PREVALÊNCIA DE POLIMORFISMOS DO GENE *NR3C1* RELACIONADOS
À SENSIBILIDADE GLICOCORTICOIDE EM PACIENTES COM
HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA**

THAIS RAMOS VILLELA

Belo Horizonte
2019

THAIS RAMOS VILLELA

**PREVALÊNCIA DE POLIMORFISMOS DO GENE *NR3C1* RELACIONADOS
À SENSIBILIDADE GLICOCORTICOIDE EM PACIENTES COM
HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Orientadora: Prof.^a Ivani Novato Silva

Belo Horizonte

2019

V735p Villela, Thais Ramos.
Prevalência de polimorfismos do Gene NR3C1 relacionados à sensibilidade Glicocorticoide em pacientes com Hiperplasia Adrenal Congênita [manuscrito]. / Thais Ramos Villela. - - Belo Horizonte: 2019. 62f.: il.

Orientador (a): Ivani Novato Silva.
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Receptores de Glucocorticoides. 2. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. 3. Glucocorticoides. 4. Polimorfismo Genético. 5. Hiperplasia Suprarrenal Congênita. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Silva, Ivani Novato. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: QU 477



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

UFMG

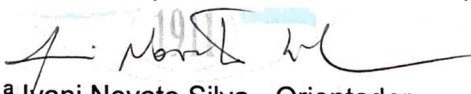
FOLHA DE APROVAÇÃO

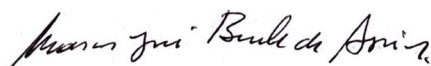
PREVALÊNCIA DE POLIMORFISMOS DO GENE NR3C1 RELACIONADOS À
SENSIBILIDADE GLICOCORTICOIDE EM PACIENTES COM HIPERPLASIA
ADRENAL CONGÊNITA

THAIS RAMOS VILLELA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Ciências da Saúde.

Aprovada em 12 de fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:


Prof.^a Iwani Novato Silva - Orientador
UFMG


Prof. Marcos José Burle de Aguiar
UFMG


Prof.^a Tânia Maria Barreto Rodrigues
UFJF

Belo Horizonte, 12 de fevereiro de 2019.

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 Júnior

Pró-reitor de Pesquisa: Prof. Mário Fernando Montenegro Campo

Faculdade de Medicina:

Diretor: Prof. Humberto José Alves

Vice-diretora: Prof^ª. Alamanda Kfoury Pereira

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

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

Departamento de Pediatria:

Chefe: Prof^ª. Monica 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 de Miranda

Membros do Colegiado da Pós-graduação:

Prof^ª. Ana Cristina Simões e Silva

Prof. Eduardo Araújo de Oliveira

Prof. Jorge Andrade Pinto

Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira

Prof^ª. Helena Maria Gonçalves Becker

Prof^ª. Ana Cristina Côrtes Gama

Prof^ª. Roberta Maia de Castro Romanelli

Prof^ª. Luana Caroline dos Santos

Prof^ª. Juliana Gurgel

Prof^ª. Ivani Novato Silva

Prof^a. Débora Marques de Miranda

Prof. Leandro Fernandes Malloy Diniz

Prof. Sérgio Veloso Brant Pinheiro

Prof. Cássio da Cunha Ibiapina

Prof^a. Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana

Prof^a. Lêni Márcia Anchieta

Ariene Silva do Carmo

Elisângela Pessoa de Aguiar

AGRADECIMENTOS

À Professora Ivani Novato Silva, minha orientadora, pelo carinho, incentivo, ensinamentos e disponibilidade.

À Professora Cristina Botelho Barra, pela idealização do trabalho, por ter me acompanhado na jornada até sua conclusão e por estar sempre disposta a ensinar.

À Professora Ana Cristina Simões e Silva e ao André Rolim Belisário pelo auxílio no Laboratório.

Ao Professor Marcelo Rizzatti Luizon por ter me ajudado a desvendar os mistérios da Genética.

Aos meus amigos, em especial a equipe de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG, pela convivência e por tornarem essa caminhada mais prazerosa.

À minha família, pelo amor, suporte e apoio incondicionais.

RESUMO

A reposição hormonal com glicocorticoides é a base do tratamento da hiperplasia adrenal congênita (HAC), na forma clássica por deficiência de 21-hidroxilase (21OHD). Como não há possibilidade de reprodução exata da secreção fisiológica de cortisol, uma das dificuldades do tratamento é encontrar a dose adequada de glicocorticoide para inibir o excesso de produção androgênica, mas que não seja excessiva e capaz de provocar efeitos adversos, o que na prática constitui um desafio. Muitos fatores podem dificultar a resposta terapêutica. Entre esses possíveis fatores, evidências tem sugerido que polimorfismos (SNPs) do gene *NR3C1*, que codifica os receptores de glicocorticoide (GR), seriam responsáveis por um *set point* para a sensibilidade aos glicocorticoides, geneticamente determinado. O objetivo deste estudo foi determinar a frequência dos polimorfismos associados à sensibilidade aos glicocorticoides, mais estudados até o momento, em pacientes com HAC por 21OHD na forma clássica e comparar com um grupo controle. Foram estudados 265 indivíduos: 102 pacientes com 21OHD, mediana de idade 8,95 anos (IQ: 2,13-17,95), e 163 controles, mediana de idade 31 anos (IQ: 27-41). Todos os pacientes e controles foram genotipados e seus haplótipos estimados para os SNPs *BclI* (rs41423247), *N363S* (rs56149945), *ER22/23EK* (rs6189 and rs6190), *ThtIII* (rs10052957) e *9β* (rs6198). Todos os polimorfismos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências dos SNPs nos pacientes, mensuradas pela frequência do alelo menor, foram: *BclI* 26.0%, *N363S* 0.5%, *ER22/23EK* 2.5%, *ThtIII* 32.8% e *9β* 16.2%, sem diferença significativa entre pacientes e controles (teste do qui-quadrado). A frequência da maior parte dos SNPs genotipados foi semelhante ao encontrado na população europeia, na comparação com o Projeto 1000 Genomas. O SNP *ThtIII*, em heterozigose (GA), foi mais prevalente nos pacientes (OR: 2.186; p: 0,004), enquanto o *BclI*, também em heterozigose (CG), foi mais prevalente nos controles (OR: 0.581; p: 0,049). Além disso, o haplótipo “T,G,T,C,C,G”, que contém apenas o SNP *BclI*, foi mais frequente no grupo controle (OR 0.56; p: 0,017). Nesse estudo foi encontrada maior frequência do SNP *ThtIII*, em heterozigose, nos pacientes com 21OHD, comparados ao grupo controle. O *ThtIII* tem sido associado a maior resistência glicocorticoide e, também, a um perfil metabólico mais saudável. No grupo controle foi encontrada maior frequência do *BclI* e do haplótipo que o contém isoladamente, ambos relacionados a maior sensibilidade glicocorticoide. Estes achados sugerem que uma parcela dos pacientes com HAC por 21OHD poderia apresentar algum grau de resistência aos glicocorticoides e, conseqüentemente, necessitar de doses mais elevadas de reposição do que o estabelecido para a população saudável, para inibir a produção androgênica.

Palavras-chave: receptor de glicocorticoide; polimorfismos do gene do receptor de glicocorticoide; SNPs; hiperplasia adrenal congênita

ABSTRACT

The mainstay treatment in the classic forms of congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency (21OHD) is chronic glucocorticoid therapy. Since it's not possible to reproduce the physiological secretion of cortisol, one of the difficulties of the treatment is to find the adequate dose of glucocorticoid to inhibit excess androgen production, but that is not excessive, and avoid potential side effects, which is difficult in clinical practice. Many factors may hinder the therapeutic response. Among these possible factors, evidence has suggested that polymorphisms (SNPs) of the *NR3C1* gene, which encodes the glucocorticoid (GR) receptor, would be responsible for a genetically determined set point for glucocorticoid sensitivity. The aim of this study was to determine the frequency of SNPs, previously associated to glucocorticoid sensitivity, in patients with CAH due to 21OHD and compare to general population. We analyzed 265 subjects: 102 patients with 21OHD, mean age 8,95 years (IQ: 2,13-17,95), and 163 controls, mean age 31 years (IQ: 27-41). All patients and controls were genotyped, and their haplotype block were estimated, for *BclI* (rs41423247), *N363S* (rs56149945), *ER22/23EK* (rs6189 and rs6190), *ThtIII* (rs10052957) and *9β* (rs6198). Hardy-Weinberg equilibrium was observed in all SNPs. SNP frequencies in patients, measured by minor allele frequency, were *BclI* 26.0%, *N363S* 0.5%, *ER22/23EK* 2.5%, *ThtIII* 32.8% and *9β* 6.2%, without any significant difference between patients and controls (chi-square test). The frequencies of most *NR3C1* polymorphisms genotyped were similar to European population researched in 1000 Genomes Project. The heterozygous genotype (GA) for *ThtIII* was significant higher in patients (OR: 2.186; p: 0,004), while heterozygous genotype for *BclI* (CG) was significant higher in controls (OR: 0.581; p: 0,049). Besides that, the "T,G,T,C,C,G" haplotype, that contains only the *BclI* SNP, was more common in control group (OR 0.56; p: 0,017). Our study demonstrates higher frequencies of heterozygous genotype for *ThtIII* in patients with 21OHD, compared to the healthy group that had higher frequencies of heterozygous genotype for *BclI* and for the haplotype with only this SNP. The SNP *ThtIII* was previously associated with a relative resistance to glucocorticoids and a healthy metabolic profile. These finds suggests that some patients with CAH due to 21OHD could present some degree of glucocorticoid resistance and could require higher doses of glucocorticoid to inhibit androgen production, than that established based on the healthy population.

Key words: glucocorticoid receptors; glucocorticoid receptor gene polymorphisms; SNPs; congenital adrenal hyperplasia

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11 β -HSD1: 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1

11 β -HSD2: 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2

17OHP: 17 α -hidroxiprogesterona

21OH: 21- α hidroxilase

21OHD: deficiência de 21 α -hidroxilase

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

AP1: proteína ativadora 1

CBG: globulina ligadora do cortisol

CRH: hormônio liberador de corticotrofina

D': coeficiente de desequilíbrio padronizado

DHT: 5 α -dihidrotestosterona

DL: desequilíbrio de ligação

EDTA: ácido etilenodiamino tetraacético

FAM: frequência do alelo menor

GR: receptor de glicocorticoide

GRE: elemento responsivo aos glicocorticoides

GWAS: estudo de associação genômica ampla

HAC: hiperplasia adrenal congênita

HDL: lipoproteínas plasmáticas de alta densidade

HOMA-IR: Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (Modelo de avaliação da homeostase para resistência insulínica)

HSP: proteínas de choque térmico

IC: intervalo de confiança

IMC: índice de massa corporal

LDL: lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade

LOD: Log of the likelihood odds ratio (Log de probabilidade do odds ratio)

NCBI: National Center for biotechnology information

NF- κ B: fator nuclear κ B

OR: odds ratio

PCR-RFLP: reação em cadeia da polimerase, associada com polimorfismo de fragmentos de DNA obtidos por enzima de restrição

qPCR: reação em cadeia da Polimerase em tempo real

rsSNP: referência do polimorfismo de nucleotídeo único

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único

TARTs: tumores de restos adrenais testiculares

UTR: região não traduzidas

VS: forma virilizante simples

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Revisão da Literatura

Figura 1	Amostras populacionais avaliadas no Projeto 1000 Genomas.....	27
Figura 2	Genotipagem do <i>BclI</i>	43

Artigo

Figura 1	Desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos do gene <i>NR3C1</i>	62
Tabela 1	Frequência dos polimorfismos nos pacientes com 21OHD e nos controles...	60
Tabela 2	Distribuição dos polimorfismos nos pacientes com 21OHD e nos controles	61
Tabela 3	Distribuição dos haplótipos.....	62
Tabela 4	Frequência dos polimorfismos nos pacientes com 21OHD e no projeto 1000 Genomas.....	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Hiperplasia adrenal congênita.....	17
2.2	Deficiência de 21 α -hidroxilase.....	17
2.2.1	Tratamento da 21OHD.....	20
2.2.2	Dificuldades do tratamento a longo prazo.....	20
2.3	Glicocorticoides.....	22
2.3.1	Receptor de glicocorticoide (GR)	22
2.3.2	Sensibilidade aos glicocorticoides.....	24
2.4	Polimorfismos do GR.....	25
2.4.1	Polimorfismo <i>BclI</i>	28
2.4.2	Polimorfismo <i>N363S</i>	29
2.4.3	Polimorfismo <i>Tht III</i>	30
2.4.4	Polimorfismo <i>ER22/23EK</i>	31
2.4.5	Polimorfismo <i>9β</i>	32
2.4.6	Outros polimorfismos.....	33
	REFERÊNCIAS	34
3	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo geral.....	39
3.2	Objetivos específicos.....	39
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	40

4.1	Casuística.....	40
4.2	Métodos.....	41
4.2.1	Avaliação genética.....	41
4.2.2	Aspectos éticos.....	43
4.2.3	Análise estatística.....	43
REFERÊNCIAS.....		45
ANEXOS.....		51
5	ARTIGO.....	56

1) INTRODUÇÃO

A hiperplasia adrenal congênita (HAC) secundária a deficiência da enzima 21 α -hidroxilase (21OHD) é uma doença autossômica recessiva, que leva a diminuição da secreção de cortisol e deficiência mineralocorticoide, com consequente aumento da produção de andrógenos no córtex adrenal (1). A reposição de glicocorticoide, por toda a vida, é a base do tratamento da 21OHD na forma clássica. O objetivo do tratamento é repor o cortisol deficiente e controlar o excesso de produção androgênica, com a menor dose de glicocorticoide possível, para permitir um crescimento normal e evitar os efeitos colaterais da medicação (2, 3). A dose necessária varia entre os pacientes, o que sugere um *set point* para a sensibilidade glicocorticoide, provavelmente, geneticamente determinado (4). Entre os fatores genéticos, estão os polimorfismos (SNPs) do gene do receptor de glicocorticoide, *NR3C1*. Estudos prévios demonstraram que alguns desses SNPs, como o *BcII* e o *N363S*, estão associados à maior sensibilidade glicocorticoide, enquanto outros como *ER22/23EK*, *ThtIII* e *9 β* , foram associados à resistência (5).

Diante da variabilidade na dose de glicocorticoide necessária entre os pacientes, o objetivo do trabalho foi determinar a prevalência de polimorfismos do gene do receptor de glicocorticoide, previamente relacionados a alteração da sensibilidade glicocorticoide, e com potencial impacto na resposta clínica, em pacientes com HAC por 21OHD na forma clássica. Além disso, após a genotipagem dos SNPs, foram estimados os haplótipos, que são o conjunto de polimorfismos presentes no mesmo cromossomo, herdados conjuntamente. Os dados obtidos foram comparados com um grupo controle.

A apresentação da dissertação foi organizada sob a forma de artigo, de acordo com o regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. É constituída dos seguintes tópicos: introdução (justificativa do trabalho), revisão da literatura, objetivos e métodos, redigidos de forma convencional, seguidos de um artigo original que contém resultados, discussão e conclusão. As referências bibliográficas estão dispostas ao final de cada sessão. Para as citações foi utilizado o sistema Vancouver, elaborado por um grupo de editores das principais publicações biomédicas internacionais na cidade de Vancouver, no Canadá, em 1979 e

atualizado periodicamente (*Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication* - www.ICMJE.org).

REFERÊNCIAS

1. Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *The New England journal of medicine*. 2003;349(8):776-88.
2. Cordeiro GV, Silva IN, Goulart EM, Chagas AJ, Kater CE. Final height in congenital adrenal hyperplasia: the dilemma of hypercortisolism versus hyperandrogenism. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2013;57(2):126-31.
3. Nella AA, Mallappa A, Perritt AF, Gounden V, Kumar P, Sinaii N, et al. A Phase 2 Study of Continuous Subcutaneous Hydrocortisone Infusion in Adults With Congenital Adrenal Hyperplasia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101(12):4690-8.
4. 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. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(10):5804-10.
5. Manenschijn L, van den Akker EL, Lamberts SW, van Rossum EF. Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms. An overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1179:179-98.

2) REVISÃO DA LITERATURA

2.1) Hiperplasia adrenal congênita

A hiperplasia adrenal congênita (HAC) consiste em um grupo de doenças causadas por deficiência enzimática na biossíntese do cortisol nas glândulas adrenais e consequente estímulo do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), produzido na hipófise, por mecanismo de retroalimentação em alça (*feedback*). Além da deficiência de cortisol, está presente aumento, ou diminuição, em razão da deficiência enzimática, da produção de mineralocorticoides e esteroides sexuais (1).

Embora cada complexo enzimático envolvido na síntese do cortisol no córtex adrenal possa sofrer algum comprometimento e levar a hiperplasia glandular pelo acúmulo de precursores esteroides, em aproximadamente 95% dos casos a hiperplasia adrenal é causada pela deficiência de 21 α -hidroxilase (21OH) (1, 2). Esta forma de hiperplasia adrenal está relacionada às alterações do gene CYP21A2, que codifica a P450c21, com consequente deficiência de aldosterona e cortisol e aumento de andrógenos.

A deficiência de 21OH é monogênica, resulta de herança autossômica recessiva e a maior parte dos pacientes é heterozigota composta. Há um espectro bioquímico e fenotípico da doença, que varia desde formas leves, sem clínica evidente, a formas graves. A manifestação clínica é definida pelo alelo que resulta em maior função enzimática. Na maior parte dos casos há uma boa correlação genótipo-fenótipo (3, 4).

A incidência da HAC por deficiência de 21OH (21OHD) na forma clássica, no Brasil e também no estado de Minas Gerais (5), segue a referência mundial de 1:10.000 a 1:20.000 nascimentos, geralmente em torno de 1:15.000 (6). Há uma variação substancial de acordo com a etnia e o background genético. A taxa de portadores heterozigotos é em torno de 1:60. A HAC não clássica é claramente mais comum e sua incidência nos caucasianos é de 1:1.000, chegando a 1:27 nos judeus Ashkenazi (7).

2.2) Deficiência de 21 α -hidroxilase

O gene que codifica a 21 α -hidroxilase, CYP21A2, está localizado no braço curto do cromossomo 6, especificamente dentro do locus do complexo de histocompatibilidade

(HLA) classe III. Este gene e um pseudogene homólogo, o CYP21A1P, se estendem sobre uma região de 30kb. Eventos de recombinação durante a meiose são comuns nessa região do genoma devido ao alto grau de homologia entre os genes duplicados (3, 8). A 21OHD pode ser causada por deleções, conversões e mutações pontuais no gene CYP21A2. Mais de 200 mutações foram descritas até o momento (9). Como deleções e grandes conversões eliminam a transcrição gênica, a homozigose para essas alterações leva a HAC na forma mais grave, perdedora de sal. Algumas microconversões, tais como aquelas que determinam parada prematura da tradução, também estão associadas a forma perdedora de sal. Formas mais leves, tais como a virilizante simples e não clássica, estão associadas às substituições de aminoácidos na proteína P450c21 causadas por microconversões no gene.

Como resultado da disfunção da 21OH, há diminuição na síntese de glicocorticoides e mineralocorticoides e acúmulo dos precursores esteroides anteriores ao bloqueio, com desvio para a formação de andrógenos potentes, como a testosterona e a 5 α -dihidrotestosterona (DHT), já que não há bloqueio na via de produção dos andrógenos adrenais. O principal precursor acumulado, que é o marcador da HAC, é a 17 α -hidroxiprogesterona (17OHP). Ele é usado tanto no diagnóstico quanto na monitorização do tratamento. (8, 10).

A 21OHD é dicotomizada nas formas clássica e não clássica, de acordo com o grau de deficiência enzimática. A forma clássica é, então, subdividida nas formas perdedora de sal e virilizante simples. Aproximadamente 65-75% dos pacientes com a forma clássica têm a forma perdedora de sal e os 25% restantes apresentam a forma virilizante simples.

A HAC na forma perdedora de sal (PS) é causada por mutações que inativam completamente o CYP21A2, reduzindo tanto a síntese de cortisol quanto de aldosterona. As meninas com este transtorno são frequentemente diagnosticadas ao nascimento devido a virilização da genitália externa. Se o diagnóstico não for feito ao nascimento ou por meio de testes de triagem neonatal, a crise de perda de sal se desenvolve geralmente após a segunda semana de vida, resultando em hiponatremia, hipercalemia e acidose. Hipotensão, choque e colapso cardiovascular podem resultar na morte do recém-nascido não tratado.

Na forma virilizante simples (VS) os pacientes mantêm 1-2% de função da enzima 21OH e a produção mínima de aldosterona previne o recém-nascido da crise de perda de sal (11). A exposição fetal ao excesso de andrógenos leva a virilização da genitália externa nas meninas. Sem triagem neonatal os meninos serão diagnosticados, mais comumente, entre 3 e 7 anos, com sinais de hiperandrogenismo como pubarca precoce, acne e crescimento peniano. Em ambos os sexos, há um crescimento acelerado, associado a um avanço desproporcional da idade óssea, de modo que a altura final é comprometida.

Na forma não clássica o paciente mantém de 20% a 50% da atividade da 21OH e a grande maioria não tem insuficiência adrenal mas pode apresentar deficiência parcial de glicocorticoide (2). A genitália externa é normal no sexo feminino (12). Pode não haver manifestações fenotípicas, apenas uma resposta aumentada da 17OHP plasmática ao teste com ACTH, ou podem haver sinais de hiperandrogenismo como pubarca precoce, hirsutismo leve, acne, irregularidade menstrual e diminuição da fertilidade em mulheres adultas.

O diagnóstico da 21OHD na forma clássica é sugerido pela ambiguidade genital em meninas ou episódios de perda de sal, rápido crescimento e virilização em ambos os sexos durante a infância. A 17 OHP plasmática é marcadamente elevada, atingindo valores superiores a 10.000ng/dL (1), enquanto as pessoas não afetadas têm 17 OHP menores que 200ng/dL. Na forma não clássica é necessário estímulo com ACTH exógeno para fazer a maior parte dos diagnósticos.

Mais recentemente, o diagnóstico também pode ser feito pelos testes de triagem neonatal. Em 2009, a triagem já estava implementada em todos os estados dos Estados Unidos e outros 12 países, por ser uma doença com frequência relevante e pelo fato do diagnóstico precoce estar associado a menor morbidade e mortalidade, por prevenir a perda de sal grave (1). Em Minas Gerais, a triagem foi implantada em 2013. Apesar dos meninos terem maior benefício com a triagem, uma vez que são mais propensos ao diagnóstico tardio ou incorreto pela ausência de ambiguidade genital, as meninas com virilização grave também se beneficiam do registro civil correto (13).

2.2.1) Tratamento da 21OHD

A reposição do glicocorticoide é a base do tratamento da 21 OHD. Na forma perdedora de sal é necessário, ainda, repor mineralocorticoide. O glicocorticoide de escolha para o tratamento é a hidrocortisona (isto é, o próprio cortisol) na dose média de 10 a 15 mg/m²/dia, dividida em 3 tomadas (1). Esta dose excede o nível fisiológico da secreção do cortisol, que é de 6-7mg/m²/dia; entretanto, doses ligeiramente suprafsiológicas são necessárias para suprimir adequadamente os níveis dos andrógenos adrenais. O tratamento é desafiador pela dificuldade no fino balanço entre subdoses e doses excessivas de glicocorticoide (2).

Os objetivos do tratamento na infância e adolescência são: velocidade de crescimento normal para a idade, taxa de maturação esquelética adequada, puberdade espontânea e no momento apropriado, autoimagem positiva e evitar os potenciais efeitos do excesso de glicocorticoide (8).

A meia-vida curta da hidrocortisona minimiza os efeitos colaterais adversos que são frequentemente observados com glicocorticoides mais potentes tais como a prednisona e a dexametasona. O uso de corticoides de longa ação é evitado em crianças pelo efeito de supressão do crescimento (2). Encontrar a menor dose de glicocorticoide que permita um crescimento adequado, com controle dos andrógenos adrenais é a meta principal do tratamento (1).

2.2.2) Dificuldades do tratamento a longo prazo

A dificuldade de inibição da produção androgênica sem doses suprafsiológicas de glicocorticoide é amplamente reconhecida (14, 15). A supressão do eixo hipotalâmico-hipofisário não é sempre adequada, o que pode levar à manutenção do estímulo para a produção de andrógenos e ao conseqüente descontrole clínico-laboratorial. O hiper cortisolismo está associado a um perfil cardiovascular e metabólico desfavorável e ao hipogonadismo secundário. O hiperandrogenismo, por outro lado, também pode afetar a saúde cardiovascular, o crescimento e a fertilidade (16).

Como resultado do tratamento com corticoides e mineralocorticoides, introduzido em 1950, praticamente todos os pacientes com HAC atingem a idade adulta. Com isso, a

preocupação com comorbidades e complicações a longo prazo tornou-se maior. Os fatores de risco cardiovascular tem sido descritos com maior incidência nos pacientes com HAC (8). Nos pacientes adultos já foi documentado maior risco de obesidade, resistência insulínica (17), hipertensão arterial, dislipidemia, diabetes mellitus, tromboembolismo venoso (18), osteopenia/osteoporose (19) e infertilidade.

Mudanças desfavoráveis na função gonadal e no perfil metabólico, além de maior risco cardiovascular, já são identificados em crianças e adolescentes com 21OHD. O aumento da camada íntima média da carótida, que é um marcador de aterosclerose, foi demonstrado desde a infância (20), permanecendo alterado na vida adulta (21). 30-50% dos meninos com doses insuficientes de glicocorticoide desenvolvem tumores de restos adrenais testiculares (TARTs), o que pode prejudicar o funcionamento testicular, provavelmente por obstrução dos túbulos seminíferos (22). O aumento do índice de massa corporal (IMC) é observado desde a infância, em 16-25% dos pacientes (23), e se mantém nos adultos (24), o que pode indicar tratamento com doses excessivas de glicocorticoide. A hipertensão arterial também é mais frequente e sua incidência se relaciona ao IMC e independe da terapia mineralocorticoide e glicocorticoide utilizada (25).

O manejo do tratamento na adolescência e a transição da pediatria para a clínica são desafiadores. Neste período, ocorrem profundas mudanças hormonais. A ativação do eixo puberal e o aumento do hormônio de crescimento diminuem a atividade da *11 β -desidrogenase tipo 1* e aumentam a taxa de filtração glomerular, o que resulta em maior *clearance* do cortisol. Com isso a eficácia do glicocorticoide exógeno é reduzida. Além disso, o aumento fisiológico dos andrógenos e da resistência insulínica, próprios desta fase, são amplificados nos pacientes com 21OHD, o que dificulta ainda mais o controle (26).

Outro fator que tem grande impacto no tratamento é a aderência. Estudos mostram que na infância a taxa de adesão ao tratamento é maior, o que é atribuído ao cuidado dos pais e ao acompanhamento médico mais rigoroso. Mesmo assim, aproximadamente 20% dos pacientes são classificados como não aderentes, o que aumenta para um terço na vida adulta (27). Nos pacientes que têm boa adesão ao tratamento, a dificuldade do controle hormonal pode ser atribuída, entre outros fatores, à diferença de resposta ao glicocorticoide entre os indivíduos.

2.3) Glicocorticoides

Os glicocorticoides são moduladores em uma variedade de sistemas fisiológicos e têm um papel importante na homeostase, tanto no metabolismo basal quanto no estresse. Aproximadamente 20% dos genes expressos nos leucócitos humanos são regulados positiva ou negativamente pelos glicocorticoides (28). Têm um papel crítico nos processos biológicos como crescimento, reprodução, metabolismo intermediário, reações imunes e inflamatórias, assim como nas funções cardiovasculares e do sistema nervoso central. São os agentes imunomoduladores mais usados na medicina, empregados como anti-inflamatórios, quando administrados em doses suprafisiológicas, ou como substitutos do cortisol, como na insuficiência adrenal (29).

A secreção do cortisol pela adrenal é regulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), produzido na adenohipófise, que por sua vez é controlado pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRH) produzido no hipotálamo. O nível de cortisol circulante é regulado por *feedback* negativo, exercido pelo próprio cortisol, tanto na hipófise quanto no hipotálamo. Essa via regulatória age para manter níveis fisiológicos do hormônio (30). Por ser um hormônio lipofílico, ele não é estocado na adrenal, sendo rapidamente sintetizado quando necessário (31).

Do cortisol circulante, 95% está ligado a proteínas. 80-90% circula ligado à globulina ligadora do cortisol (CBG), 10-15% a albumina e os 5% restantes permanecem livres, atravessam passivamente a membrana celular por difusão e se ligam ao receptor de glicocorticoide intracelular (32, 33).

O ritmo de secreção é classicamente circadiano, com pico pela manhã, antecipando as atividades diárias, e níveis mais baixos a noite. Os pulsos de cortisol variam em frequência e amplitude ao longo do dia. A pulsatilidade do eixo é dinâmica e rapidamente flutuante para prover uma homeostase adequada (30).

2.3.1) Receptor glicocorticoide (GR):

O GR modula a ação dos glicocorticoides a nível celular. Esses receptores são membros da superfamília de receptores nucleares. Estão presentes virtualmente em todas as células. São codificados pelo gene *NR3C1*, localizado no braço longo do cromossomo

5 (5q31). Ele possui aproximadamente 150.000 pares de base e é composto por 9 éxons (32), dos quais o primeiro não contém sequências codificadoras e os oito restantes codificam proteínas.

Um *splicing* alternativo no éxon 9 gera duas isoformas altamente homólogas do receptor, denominadas α e β . Elas são idênticas até o aminoácido 727, quando então divergem. O GR α tem mais 50 aminoácidos e o GR β mais 15 aminoácidos não homólogos. O GR α reside em sua maioria no citoplasma, migra para o núcleo quando ligado, e representa o clássico GR que funciona como um fator de transcrição dependente do ligante. O GR β , por outro lado, não se liga ao cortisol, podendo ou não se ligar aos glicocorticoides sintéticos. Apresenta atividade transcricional independente do GR α e exerce, sobre a atividade deste último, um efeito dominante negativo (34). Outras variantes do GR já foram descritas: GR γ , que exibe aproximadamente 50% da atividade do GR α e GR-A e GR-P, que não se ligam aos glicocorticoides e pouco se sabe sobre suas funções biológicas (31).

Os GR atuam como fatores de transcrição, alterando a expressão dos genes alvo, em resposta a um sinal hormonal específico. Possuem três domínios comuns: o domínio de ligação ao ligante hormonal, localizado na extremidade carboxi-terminal; o domínio central de ligação ao DNA, que compreende também o sítio de dimerização; e o domínio de transativação na extremidade amino-terminal, responsável pela interação com os fatores de transcrição (35). Na ausência de ligação ao cortisol, o GR encontra-se inativo no citoplasma, estabilizado por um complexo proteico denominado proteínas do choque térmico (*heat shock proteins*; hsp). Esse complexo permite que o receptor adquira uma conformação tridimensional adequada para sua ligação ao hormônio.

A especificidade dos GR decorre da habilidade em reconhecer as sequências de ligação nos genes-alvo. A ligação aos fatores de transcrição ou às moléculas coativadoras é mediada pelos domínios de transativação. Os GR são capazes de agir especialmente como homodímeros, ligando-se ao DNA dupla-fita em uma sequência específica de nucleotídeos (33).

A cascata de eventos que leva a ativação ou a repressão gênica pelo cortisol inicia-se com o hormônio lipofílico cruzando a membrana citoplasmática da célula-alvo e interagindo com os GR. Após interação hormonal, ocorre uma mudança na conformação, o GR dissocia-se do complexo com as hsp, forma homodímeros com outras moléculas do

receptor ativado, transloca-se para o núcleo e interage com sequências de DNA conhecidas como elementos responsivos aos glicocorticoides (GREs), bem como com fatores de transcrição, modulando a expressão de genes-alvo. Esse mecanismo é chamado transativação. Quando se liga à GREs de efeito negativo, ocorre a transrepressão de genes-alvo (36).

O GR também modula a ação dos fatores de transcrição independente de ligação direta ao DNA, por meio de interações diretas proteína-proteína com outros fatores de transcrição (37), como a proteína ativadora 1 (AP1) e o fator nuclear κ B (NF- κ B), o que resulta na inibição de fatores transcripcionais pró-inflamatórios e explica porque os glicocorticoides são amplamente usados no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes (36).

A biodisponibilidade dos glicocorticoides a nível celular também é regulada por um mecanismo pré-receptor, responsável pela interconversão entre a forma ativa (cortisol) e inativa (cortisona) do glicocorticoide. Duas isoformas da enzima são responsáveis por essas reações: a 11β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1 (11β -HSD1) e a tipo 2 (11β -HSD2). Essas isoenzimas diferem tanto na distribuição como na função e exercem um papel crucial na concentração intracelular de glicocorticoides nos seus respectivos tecidos-alvos (38). A 11β -HSD1 atua como ativadora, gerando cortisol. É mais expressa no fígado, tecido adiposo, músculo, ilhotas pancreáticas, cérebro, células inflamatórias e gônadas. Sua elevação no tecido adiposo está associada a complicações metabólicas. Por outro lado, 11β -HSD2 atua como inativadora, gerando cortisona. É mais expressa na placenta e no feto, prevenindo a maturação prematura dos tecidos fetais e interferindo na programação metabólica (39).

2.3.2) Sensibilidade aos glicocorticoides:

A resposta clínica ao corticoide exógeno é extremamente variável. Ela está relacionada ao tipo de corticoide, à dose, ao horário de administração e a doença/célula alvo da terapêutica (40). Diferenças significativas foram observadas entre espécies, indivíduos, tecidos, tipos de células e até em relação a fase do ciclo celular em que a célula se encontra (37).

Na população saudável foi demonstrada uma variação interindividual de resposta significativa através de testes de supressão com dexametasona 0,25mg (41). Isso significa

que cada indivíduo, quando tratado com glicocorticoide, necessita de uma dose ótima para manter um balanço entre os efeitos terapêuticos e os efeitos colaterais. A dose individual, por sua vez, é relativamente estável e a resposta do cortisol é semelhante entre os diversos glicocorticoides. Isso implica que há um set point para a sensibilidade glicocorticoide, que é, provavelmente, geneticamente determinado (42).

Os fatores que interferem na sensibilidade podem atuar antes da ligação do cortisol ao GR, no próprio receptor ou após a ligação ao receptor. Entre os fatores moduladores pré-receptor destacam-se: a concentração hormonal, regulada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal e influenciada pelas concentrações da CBG e pela 11 β -HSD; a biodisponibilidade do glicocorticoide; a dissociação do GR do complexo com as hsp; a translocação nuclear do receptor ativado e a interação com os GREs e com os fatores de transcrição. Por sua vez, os principais moduladores com atuação no receptor são: a densidade intracelular de GR, a afinidade do receptor para ligação hormonal, a fosforilação do GR e as mutações e polimorfismos do GR (29). Mudanças após a transcrição também podem alterar a função do GR e contribuir para a heterogeneidade de resposta aos glicocorticoides. Entre elas destacam-se a ligação da ubiquitina a resíduos específicos de lisina, o que leva a degradação do GR pelo complexo proteossômico; mutações nos resíduos conservados de lisina, que aumentam a atividade transcricional independente do ligante e impedem o *downregulation* do GR e a acetilação do GR pelos fatores de transcrição clock, que reduzem sua atividade transcricional (31).

2.4) Polimorfismos do GR

O GR é crucial para a ação dos glicocorticoides e polimorfismos no gene *NR3C1* têm sido associados a alteração na sensibilidade glicocorticoide, sugerindo que podem modular o desenvolvimento de desordens metabólicas (43, 44). Polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês, *single nucleotide polymorphisms* ou sua abreviatura, *SNPs*) são variações pontuais encontradas ao longo da DNA. Um grande número de SNPs no gene do GR foi descrito até o momento. Em 2008 eram aproximadamente 500. Em 2014, já eram mais de 3000, em decorrência dos avanços na tecnologia de sequenciamento do DNA. A maior parte deles se localiza nos íntrons e regiões não traduzidas (UTRs) (45).

Apesar dos mecanismos não estarem completamente elucidados, os SNPs do gene *NR3C1* levam a modificações na transcrição, tanto na quantidade quanto na função codificadora (45, 46). Essas modificações podem não ter efeito funcional ou acarretar alteração na sensibilidade glicocorticoide. Os polimorfismos seriam responsáveis, pelo menos em parte, pelas alterações interindividuais.

A maior parte das associações entre variações genéticas e características clínicas vem de estudos de associação genômica ampla (GWAS). Eles são uma abordagem eficiente para identificar locus com polimorfismos de alta densidade e permitir a seleção genômica dos SNPs que serão avaliados com maior acurácia. Os GWAS norteiam a maior parte dos estudos, uma vez que avaliaram milhões de SNPs em milhões de amostras (47, 48). Para o gene *NR3C1*, os SNPs mais estudados e associados a alteração da sensibilidade glicocorticoide são: *BclI*, *Tht III*, *ER22/23EK*, *N363S* e *GR-9 β* (44).

Os SNPs do GR tem sido repetidamente associados a alterações no fenótipo nas seguintes áreas: composição corporal, sistema cardiovascular, sistema imune e desordens psiquiátricas. A maior parte dos estudos demonstrou que os polimorfismos *BclI* e *N363S* estão associados a um aumento da sensibilidade glicocorticoide, enquanto os polimorfismos *ER22/23EK*, *Tht III* e *GR-9 β* estão associados à resistência glicocorticoide (45).

Para avaliar as frequências dos SNPs e compará-las com outras populações o estudo mais robusto atualmente é o Projeto 1000 Genomas. A fase 3 do projeto foi publicada em 2015. Ele reconstruiu o genoma de 2.504 indivíduos oriundos de 26 populações, que foram posteriormente agrupadas em cinco grupos: África, Leste da Ásia, Sul da Ásia, Europa e Américas (Figura 1). A população brasileira não foi incluída. Foi caracterizado um amplo espectro de variações genéticas, em um total de 88 milhões de variantes: 84,7 milhões de SNPs, 3,6 milhões de pequenas inserções/deleções e 60.000 variantes estruturais. Essa pesquisa descreveu mais de 99% dos polimorfismos com frequência maior que 1%, em diferentes ancestralidades (49). Este projeto se sobrepôs e substituiu o HapMap, criado em 2002, que tinha como missão reconstruir os haplótipos do genoma humano.

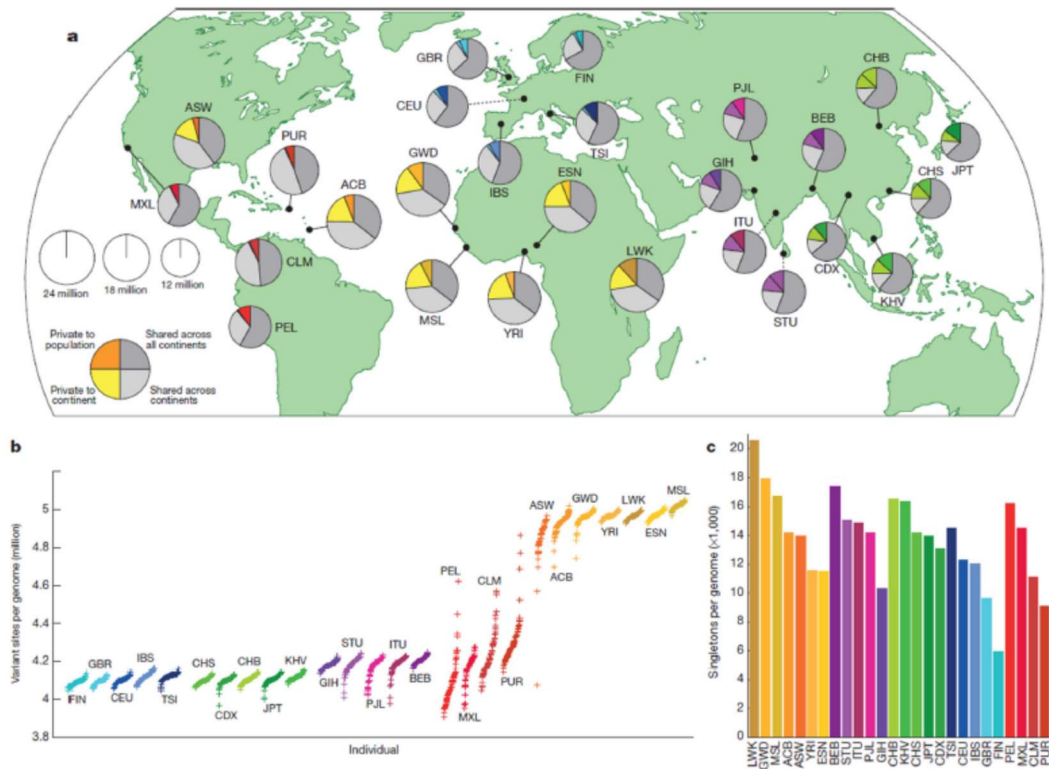


Figura 1: Amostras populacionais avaliadas no Projeto 1000 Genomas

A distribuição dos polimorfismos em uma população não é randômica. Ocorre um número de combinações em um único cromossomo, o que é denominado haplótipo. Assim, alelos adjacentes situados no mesmo segmento cromossômico são transmitidos juntos na meiose com uma frequência maior do que seria esperado pelo acaso. O uso de haplótipos aumenta o poder dos estudos de associação por aumentar a sensibilidade em detectar múltiplos efeitos na mesma região gênica. Haplótipos usando diferentes conjuntos de polimorfismos foram descritos para o gene *NR3C1*, o que é consequência da baixa taxa de recombinação entre as 150kb do gene (45).

A associação entre os alelos é medida pelo Desequilíbrio de ligação (DL). Ele é definido como a diferença entre as proporções haplotípicas observadas e aquelas esperadas se os alelos segregassem independentemente (50). Além da taxa de recombinação, a magnitude e o decaimento do DL podem ser alterados por eventos como miscigenação, deriva genética, efeito fundador, gargalos populacionais, mutação e seleção. Outros fatores, tais como idade da população, tamanho e taxa de crescimento populacional, migração e endocruzamento também podem modificar os padrões de DL.

Para o gene *NR3C1*, diferentes populações e polimorfismos foram estudados, o que gerou um conjunto de haplótipos, com sobreposição considerável entre eles. As

populações estudadas são principalmente de origem caucasiana, o que tem relevância já que os polimorfismos *N363S* e *ER22/23EK* são encontrados em uma frequência muito baixa na população asiática (51).

2.4.1) Polimorfismo *BclI*

O polimorfismo *BclI* (rs41423247) consiste na substituição de citosina por guanina (C>G) no íntron 2, 646 pares de bases a partir do éxon 2, resultando em dois fragmentos de 2,2kb e 3,9kb, com alteração da sequência TGATCA para TGATGA. Ele foi inicialmente identificado através de uma sonda específica, pelo método Southern-Blot, que encontrou dois alelos com fragmentos de 4,5kb e 2,3kb (52).

Desde então, diversos estudos demonstraram que este polimorfismo está associado a alterações na função do GR. Alterações na sensibilidade tecido-específica, com a presença do alelo G (alelo menor) associada a maior sensibilidade, além de alterações no feedback do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal foram descritas (53). Uma hipótese para explicar esses fenômenos seria um possível desequilíbrio de ligação entre o *BclI* e outros polimorfismos localizados em regiões regulatórias, que poderiam alterar o fenótipo (54).

A presença deste polimorfismo tem sido repetidamente associada a alterações de humor e psicopatologias, como hipomania e bulimia nervosa, além de hipertensão arterial, síndrome metabólica e, especialmente, hiperinsulinemia e obesidade, reforçando que ele altera a funcionalidade do GR. Em pacientes com asma, o *BclI* explica, pelo menos em parte, o desenvolvimento de asma grave associada a resistência glicocorticoide (55). Em crianças com leucemia foi encontrado maior prevalência dos efeitos colaterais dos glicocorticoides, como a Síndrome de Cushing, dispepsia e sintomas de depressão, nos pacientes com o polimorfismo *BclI* (56). A presença do polimorfismo também foi associada a menor gravidade da oftalmopatia nos pacientes com Doença de Graves (57) e tem um efeito protetor no desenvolvimento de doenças autoimunes sistêmicas, na população caucasiana (58).

Em um estudo brasileiro, realizado com 68 pacientes adultos com HAC por 21OHD, em tratamento exclusivamente com dexametasona e controle hormonal semelhante, os pacientes heterozigotos para o polimorfismo *BclI* apresentavam índices

maiores de: IMC, circunferência abdominal e pressão arterial sistólica, quando comparados aos pacientes selvagens, sem o polimorfismo. Os resultados desse estudo sugeriram ainda, que os pacientes com esse polimorfismo necessitariam de menores doses de glicocorticoides para controle da HAC (59).

A frequência do polimorfismo *BclII* é de aproximadamente 25%, o que varia com a ancestralidade da população (60). No projeto 1000 Genomas (NCBI ID ss1317539254) (49) foi encontrada uma frequência geral de 25,4% para o alelo menor, com as seguintes variações de acordo com a origem da população: 24,2% para a população do leste asiático, 37,9% para a europeia, 20,0% para a africana, 26,3% para a americana e 20,5% para a população do sul da Ásia.

Na população brasileira, a frequência do alelo menor foi 25%, em uma população de 264 indivíduos saudáveis. Na avaliação por ancestralidade foram encontradas frequências de 24,2% para a origem caucasiana (n=230), 29,0% para a africana (n=31) e 50% para a asiática (n=3) (61).

Em estudo, com 41 crianças e adolescentes com HAC por 21OHD forma clássica, a frequência do alelo menor foi de 23,1% (62). Em 68 adultos, também com a forma clássica da 21OHD, foi 26,4% (59). Em 34 adultos com síndrome metabólica e 40 controles saudáveis, as frequências foram 22% e 33,75%, respectivamente (63). Em 97 mulheres, com síndrome dos ovários policísticos, foi observada a frequência de 24,7% (64). Em 64 pacientes com síndrome de Cushing, o alelo menor correspondeu a 36% dos alelos (65).

2.4.2) Polimorfismo *N363S*

O polimorfismo *N363S* (rs6195, modificado posteriormente para rs56149945) está localizado no códon 363 do éxon 2 do GR e consiste na substituição de adenina por guanina (AAT→ AGT). Esta alteração leva troca de asparagina para serina (66). A presença do polimorfismo foi associada ao aumento da sensibilidade glicocorticoide, por maior transativação do receptor (67).

Diversos estudos encontraram associação entre este polimorfismo e maiores índices de massa corporal (IMC) (68) e níveis de insulina (67). Sua presença também foi

associada a maior prevalência de diabetes mellitus tipo 2 e doença coronariana (69). Por outro lado, em estudo que avaliou homens com o *N363S*, não foi observada associação entre o polimorfismo, níveis de colesterol e tolerância a glicose (70). Pela maior sensibilidade glicocorticoide, esperava-se menor susceptibilidade a doenças autoimunes, o que não foi demonstrado (58).

No projeto 1000 Genomas (NCBI ID ss1317539264) foi encontrada uma frequência geral de 0,62% para o alelo menor, com as seguintes variações de acordo com a origem da população: 1,79% para a europeia, 0,08% para a africana, 1,15% para a americana, 0,41% para a população do sul da Ásia e não foi encontrado nos indivíduos do leste asiático.

Na população brasileira, sua frequência foi determinada nos seguintes estudos: em 380 indivíduos saudáveis e a frequência do alelo menor foi de 1,85%. Na avaliação por ancestralidade foram encontradas frequências de 2,0% para a origem caucasiana (n:276), 2,2% para a africana (n:70) e o alelo menor não foi encontrado nos indivíduos de origem asiática (n:34) (61). Em 68 pacientes adultos, portadores de HAC forma clássica, ele foi encontrado em apenas um paciente, em heterozigose (59). Em outro estudo, que avaliou 34 pacientes, com síndrome metabólica e 40 controles saudáveis, ele não foi encontrado (63). Em 64 pacientes com síndrome de Cushing, ele foi encontrado, em heterozigose, em apenas dois pacientes, 1,5% dos alelos (65). Em 295 indivíduos, 195 obesos e 100 com peso normal, 10 pacientes heterozigotos foram encontrados, o que corresponde a uma frequência do alelo menor de 1,7% (71).

2.4.3) Polimorfismo *Th1 III*

O polimorfismo *Th1 III* (rs10052957) caracteriza-se por uma substituição de citosina por timina, 6305 pares de bases a partir do primeiro códon de iniciação, em um íntron, localizado entre dois éxons alternativos (45). A presença do polimorfismo foi originalmente associada a resistência glicocorticoide e níveis mais elevados de cortisol basal (72).

Contudo, outros estudos sugeririam que ele não tem efeito autônomo, e sim, que seu efeito resulta da associação com outros polimorfismos: o *9β*, o *ER22/23EK* ou o *BclI*.

Quando associado ao *ER22/23EK* foi observado resistência aos glicocorticoides e níveis mais baixos de insulina e LDL colesterol (73).

No projeto 1000 Genomas (NCBI ID ss1317539459) foi encontrada uma frequência geral de 22,12% para o alelo menor, com as seguintes variações de acordo com a origem da população: 32,11% para a europeia, 26,69% para a africana, 20,4% para a americana, 17,59 para a população do sul da Ásia e 11,70% para a população do leste asiático. Não foram encontrados estudos com ênfase na frequência desse polimorfismo na população brasileira.

2.4.4) Polimorfismo *ER22/23EK*

O polimorfismo *ER22/23EK* (rs6189 e rs6190) está localizado no domínio de transcrição do éxon 2 do GR, nos códons 22 e 23. São mutações de nucleotídeo único e estão sempre associadas. A primeira mutação é silenciosa, alterando o códon 22 de GAG para GAA, ambos codificando ácido glutâmico. A segunda, no códon 23, de AGG para AAG, resulta na tradução de lisina no lugar de arginina (66, 74).

Este polimorfismo está associado à resistência aos glicocorticoides e o fenótipo dos portadores é descrito como um perfil metabólico mais saudável, incluindo níveis plasmáticos mais baixos de colesterol total, LDL e de insulina no jejum, maior sensibilidade a insulina e menor risco de diabetes mellitus tipo 2 (75). Além disso, os níveis de proteína C reativa, que estão associados a maior risco cardiovascular, são mais baixos. Ele também foi relacionado a maior risco de depressão e menor risco de demência nos pacientes idosos. Por ser mais prevalente em indivíduos mais velhos, foi associado, ainda, à maior longevidade. (76).

O mecanismo para explicar a redução da sensibilidade glicocorticoide é que o polimorfismo se localiza em uma parte do gene que codifica o domínio de transativação, e, uma parte maior de GR- α menos ativo transcricionalmente é formada (74).

No projeto 1000 Genomas (NCBI ID ss1317539291 e ss1317539290) foi encontrada frequência geral de 1,06% para o *ER22/23EK*, com as seguintes variações de acordo com a origem da população: 2,98% para a europeia, não foi encontrado na

população africana, 0,58% para a americana, 1,84 para a população do sul da Ásia e 0,1% para a população do leste asiático.

Na população brasileira a frequência encontrada, em amostra de 264 indivíduos saudáveis, foi de 0,2%. Na avaliação por ancestralidade, o polimorfismo não foi detectado nos indivíduos de origem africana (n=31) e asiática (n=3). Foi encontrado exclusivamente na população de origem caucasiana (n=230), em uma frequência de 2,2% (61). No estudo brasileiro citado anteriormente, que avaliou 68 adultos com HAC forma clássica, este polimorfismo foi encontrado em apenas um paciente, em heterozigose (59). Em avaliação, de 34 adultos com síndrome metabólica e 40 controles, a frequência de alelo menor encontrada foi de 1,5 e 1,25%, respectivamente (63). Em 64 pacientes com síndrome de Cushing, ele foi encontrado, em heterozigose, em apenas dois pacientes: 1,5% dos alelos (65).

2.4.5) Polimorfismo 9β

O polimorfismo 9β (rs6198 ou A3669G) consiste na substituição de adenina por guanina e está localizado no éxon 9 do GR β , uma região não traduzida. Sua presença foi associada à resistência aos glicocorticoide. O mecanismo proposto é que a presença do polimorfismo aumente a estabilidade da variante GR β que inibe a variante funcional GR α , o que foi demonstrado *in vitro* (77, 78).

Este polimorfismo está associado a um perfil metabólico mais saudável, com menores níveis plasmáticos de colesterol total, maiores níveis de HDL, além de menor risco de obesidade em mulheres (60). Ele também foi associado a menor susceptibilidade à colonização nasal por *Staphylococcus aureus* (79) e maior susceptibilidade a artrite reumatoide (80), o que sugere um efeito mediado pelo GR no sistema imune.

No projeto 1000 Genomas (NCBI ID ss1317536213) foi encontrada frequência geral de 8,39% para o alelo menor, com as seguintes variações de acordo com a origem da população: 17,4% para a europeia, 2,34% para a população africana, 9,50% para a americana, 15,03% para a população do sul da Ásia e 0,1% para a população do leste asiático.

Na população brasileira, ele foi avaliado: em 41 crianças e adolescentes com HAC forma clássica, a frequência do alelo menor foi de 9,7%. Neste estudo, a presença do polimorfismo foi associada a um perfil metabólico pior, com níveis mais elevados de LDL (62). Em outro estudo, realizado com 68 adultos com HAC forma clássica, que também avaliou o *BclI*, a frequência do alelo menor foi de 9,6%. Neste estudo não foram encontradas diferenças nos fatores de risco cardiovascular: índice de massa corporal, circunferência abdominal, pressão arterial, HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance*) e perfil lipídico entre os portadores do polimorfismo e os selvagens (59).

Em uma avaliação, feita em duas fases, a primeira com 131 adolescentes saudáveis, de 10 a 17 anos, de Porto Alegre, e a segunda, com 74 adolescentes, as frequências foram de 18,3 e 14,9%, respectivamente (81). Em 97 pacientes, com síndrome dos ovários policísticos, foi de 13,4% (64). Em 64 pacientes com síndrome de Cushing, foi de 14% (65). Em 228 adolescentes, dos quais 131 tinham transtorno de ansiedade e o restante era o grupo controle, foi de 9% em ambos os grupos (82).

2.4.6) Outros polimorfismos

Além dos polimorfismos descritos anteriormente, outros polimorfismos do gene *NR3C1* também têm sido estudados, entre eles: *NR3C1-1* (rs10482605), *Íntron B* (rs 33389), *Íntron D* (rs6188), *Íntron G* (rs 258813) e *N766N* (rs 6196). A justificativa para o maior foco dado a esses polimorfismos é que eles foram os primeiros descritos e, a partir do momento que foram associados a alteração da sensibilidade glicocorticoide, outros estudos, em diferentes condições em que os glicocorticoides desempenham um papel, foram sendo realizados (45). Este fenômeno é conhecido como “*winners course*”. Trata-se de um viés no qual o efeito de uma alteração genética é superestimado. Como nos estudos os recursos são limitados, os SNPs candidatos, escolhidos a partir dos GWAS, podem estar associados a outros, que são a verdadeira causa da alteração fenotípica. O fato de estudos prévios associarem um SNP a alterações clínicas faz com que esses estudos sejam replicados, o que superestima o papel deste SNP. Esse fenômeno reforça a necessidade de replicação dos estudos, em populações com diferentes condições clínicas e diferentes ancestralidades (48).

REFERÊNCIAS

1. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010/09/09 ed2010. p. 4133-60.
2. Witchel SF. Congenital Adrenal Hyperplasia. *Journal of pediatric and adolescent gynecology*. 2017;30(5):520-34.
3. Finkelstein GP, Chen W, Mehta SP, Fujimura FK, Hanna RM, Van Ryzin C, et al. Comprehensive genetic analysis of 182 unrelated families with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(1):E161-72.
4. New MI, Abraham M, Gonzalez B, Dumic M, Razzaghy-Azar M, Chitayat D, et al. Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(7):2611-6.
5. Barra CB, Silva IN, Pezzuti IL, Januario JN. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Revista da Associacao Medica Brasileira (1992)*. 2012;58(4):459-64.
6. Therrell BL. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2001;30(1):15-30.
7. Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New MI. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *American journal of human genetics*. 1985;37(4):650-67.
8. El-Maouche D, Arlt W, Merke DP. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet (London, England)*. 2017;390(10108):2194-210.
9. Bruque CD, Delea M, Fernandez CS, Orza JV, Taboas M, Buzzalino N, et al. Structure-based activity prediction of CYP21A2 stability variants: A survey of available gene variations. *Scientific reports*. 2016;6:39082.
10. Turcu AF, Auchus RJ. Adrenal steroidogenesis and congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2015;44(2):275-96.
11. Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *The New England journal of medicine*. 2003;349(8):776-88.
12. Bidet M, Bellanne-Chantelot C, Galand-Portier MB, Tardy V, Billaud L, Laborde K, et al. Clinical and molecular characterization of a cohort of 161 unrelated women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency and 330 family members. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(5):1570-8.
13. Thil'en A, Nordenstrom A, Hagenfeldt L, von Döbeln U, Guthenberg C, Larsson A. Benefits of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in Sweden. *Pediatrics*. 1998;101(4):E11.
14. Cordeiro GV, Silva IN, Goulart EM, Chagas AJ, Kater CE. Final height in congenital adrenal hyperplasia: the dilemma of hypercortisolism versus hyperandrogenism. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2013;57(2):126-31.
15. Nella AA, Mallappa A, Perritt AF, Gounden V, Kumar P, Sinaii N, et al. A Phase 2 Study of Continuous Subcutaneous Hydrocortisone Infusion in Adults With Congenital Adrenal Hyperplasia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101(12):4690-8.
16. Mooij CF, Webb EA, Claahsen van der Grinten HL, Krone N. Cardiovascular health, growth and gonadal function in children and adolescents with congenital adrenal hyperplasia. *Archives of disease in childhood*. 2017;102(6):578-84.
17. Arlt W, Willis DS, Wild SH, Krone N, Doherty EJ, Hahner S, et al. Health status of adults with congenital adrenal hyperplasia: a cohort study of 203 patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(11):5110-21.

18. Falhammar H, Frisen L, Hirschberg AL, Norrby C, Almqvist C, Nordenskjold A, et al. Increased Cardiovascular and Metabolic Morbidity in Patients With 21-Hydroxylase Deficiency: A Swedish Population-Based National Cohort Study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(9):3520-8.
19. El-Maouche D, Collier S, Prasad M, Reynolds JC, Merke DP. Cortical bone mineral density in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Clinical endocrinology*. 2015;82(3):330-7.
20. Rodrigues TM, Barra CB, Santos JL, Goulart EM, Ferreira AV, Silva IN. Cardiovascular risk factors and increased carotid intima-media thickness in young patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Archives of endocrinology and metabolism*. 2015;59(6):541-7.
21. Sartorato P, Zulian E, Benedini S, Mariniello B, Schiavi F, Bilora F, et al. Cardiovascular risk factors and ultrasound evaluation of intima-media thickness at common carotids, carotid bulbs, and femoral and abdominal aorta arteries in patients with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(3):1015-8.
22. Claahsen-van der Grinten HL, Otten BJ, Hermus AR, Sweep FC, Hulsbergen-van de Kaa CA. Testicular adrenal rest tumors in patients with congenital adrenal hyperplasia can cause severe testicular damage. *Fertility and sterility*. 2008;89(3):597-601.
23. Volkl TM, Simm D, Beier C, Dorr HG. Obesity among children and adolescents with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics*. 2006;117(1):e98-105.
24. Auchus RJ, Arlt W. Approach to the patient: the adult with congenital adrenal hyperplasia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(7):2645-55.
25. Volkl TM, Simm D, Dotsch J, Rascher W, Dorr HG. Altered 24-hour blood pressure profiles in children and adolescents with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(12):4888-95.
26. Choi JH, Yoo HW. Management issues of congenital adrenal hyperplasia during the transition from pediatric to adult care. *Korean journal of pediatrics*. 2017;60(2):31-7.
27. Jenkins-Jones S, Parviainen L, Porter J, Withe M, Whitaker MJ, Holden SE, et al. Poor compliance and increased mortality, depression and healthcare costs in patients with congenital adrenal hyperplasia. *European journal of endocrinology*. 2018;178(4):309-20.
28. Galon J, Franchimont D, Hiroi N, Frey G, Boettner A, Ehrhart-Bornstein M, et al. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002;16(1):61-71.
29. Longui CA, Faria CD. Evaluation of glucocorticoid sensitivity and its potential clinical applicability. *Hormone research*. 2009;71(6):305-9.
30. Lightman SL, Conway-Campbell BL. The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nature reviews Neuroscience*. 2010;11(10):710-8.
31. Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2016;42(1):15-31, vii.
32. Song QQ, Xie WY, Tang YJ, Zhang J, Liu J. Genetic variation in the glucocorticoid pathway involved in interindividual differences in the glucocorticoid treatment. *Pharmacogenomics*. 2017;18(3):293-316.
33. Faria CD, Longui CA. [Molecular aspects of glucocorticoid sensitivity]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2006;50(6):983-95.
34. 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.
35. Zhang Z, Burch PE, Cooney AJ, Lanz RB, Pereira FA, Wu J, et al. Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. *Genome research*. 2004;14(4):580-90.

36. Stahn C, Lowenberg M, Hommes DW, Buttgereit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Molecular and cellular endocrinology*. 2007;275(1-2):71-8.
37. Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocrine reviews*. 1996;17(3):245-61.
38. Quinkler M, Oelkers W, Diederich S. Clinical implications of glucocorticoid metabolism by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases in target tissues. *European journal of endocrinology*. 2001;144(2):87-97.
39. Chapman K, Holmes M, Seckl J. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action. *Physiological reviews*. 2013;93(3):1139-206.
40. Lamberts SW, Huizenga AT, de Lange P, de Jong FH, Koper JW. Clinical aspects of glucocorticoid sensitivity. *Steroids*. 1996;61(4):157-60.
41. 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. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(1):47-54.
42. 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. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(10):5804-10.
43. van Rossum EF, Lamberts SW. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent progress in hormone research*. 2004;59:333-57.
44. Manenschijn L, van den Akker EL, Lamberts SW, van Rossum EF. Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms. An overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1179:179-98.
45. Koper JW, van Rossum EF, van den Akker EL. Glucocorticoid receptor polymorphisms and haplotypes and their expression in health and disease. *Steroids*. 2014;92:62-73.
46. Koetz KR, van Rossum EF, Vents M, Diederich S, Quinkler M. BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with increased bone resorption in patients on glucocorticoid replacement therapy. *Clinical endocrinology*. 2013;78(6):831-7.
47. Li H, Su G, Jiang L, Bao Z. An efficient unified model for genome-wide association studies and genomic selection. *Genetics, selection, evolution : GSE*. 2017;49(1):64.
48. Palmer C, Pe'er I. Statistical correction of the Winner's Curse explains replication variability in quantitative trait genome-wide association studies. *PLoS genetics*. 2017;13(7):e1006916.
49. The Genomes Project C. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526:68.
50. Weiss KM, Clark AG. Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. *Trends in genetics : TIG*. 2002;18(1):19-24.
51. Syed AA, Irving JA, Redfern CP, Hall AG, Unwin NC, White M, et al. Low prevalence of the N363S polymorphism of the glucocorticoid receptor in South Asians living in the United Kingdom. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(1):232-5.
52. Murray JC, Smith RF, Ardinger HA, Weinberger C. RFLP for the glucocorticoid receptor (GRL) located at 5q11-5q13. *Nucleic acids research*. 1987;15(16):6765.
53. Fleury I, Beaulieu P, Primeau M, Labuda D, Sinnett D, Krajcinovic M. Characterization of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene. *Clinical chemistry*. 2003;49(9):1528-31.
54. Tremblay A, Bouchard L, Bouchard C, Despres JP, Drapeau V, Perusse L. Long-term adiposity changes are related to a glucocorticoid receptor polymorphism in young females. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(7):3141-5.

55. Zopf K, Frey KR, Kienitz T, Ventz M, Bauer B, Quinkler M. BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor and adrenal crisis in primary adrenal insufficiency. *Endocrine connections*. 2017;6(8):685-91.
56. Kaymak Cihan M, Karabulut HG, Yurur Kutlay N, Ilgin Ruhi H, Tukun A, Olcay L. Association Between N363S and BclI Polymorphisms of the Glucocorticoid Receptor Gene (NR3C1) and Glucocorticoid Side Effects During Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment. *Turkish journal of haematology : official journal of Turkish Society of Haematology*. 2017;34(2):151-8.
57. Boyle B, Koranyi K, Patocs A, Liko I, Szappanos A, Bertalan R, et al. Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene in Graves ophthalmopathy. *The British journal of ophthalmology*. 2008;92(1):131-4.
58. Herrera C, Marcos M, Carbonell C, Miron-Canelo JA, Espinosa G, Cervera R, et al. Association between allelic variants of the human glucocorticoid receptor gene and autoimmune diseases: A systematic review and meta-analysis. *Autoimmunity reviews*. 2018;17(5):449-56.
59. Moreira RP, Gomes LG, Mendonca 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.
60. Vitellius G, Trabado S, Bouligand J, Delemer B, Lombes M. Pathophysiology of Glucocorticoid Signaling. *Annales d'endocrinologie*. 2018;79(3):98-106.
61. Souza MC, Martins CS, Silva-Junior IM, Chriguer RS, Bueno AC, Antonini SR, et al. NR3C1 polymorphisms in Brazilians of Caucasian, African, and Asian ancestry: glucocorticoid sensitivity and genotype association. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2014;58(1):53-61.
62. Moreira RPP, Gomes LG, Madureira G, Mendonca BB, Bachega TASS. Influence of the A3669G Glucocorticoid Receptor Gene Polymorphism on the Metabolic Profile of Pediatric Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia. *International Journal of Endocrinology*. 2014;2014:594710.
63. Martins CS, Elias D, Colli LM, Couri CE, Souza MC, Moreira AC, et al. HPA axis dysregulation, NR3C1 polymorphisms and glucocorticoid receptor isoforms imbalance in metabolic syndrome. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2017;33(3).
64. Maciel GA, Moreira RP, Bugano DD, Hayashida SA, Marcondes JA, Gomes LG, et al. Association of glucocorticoid receptor polymorphisms with clinical and metabolic profiles in polycystic ovary syndrome. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*. 2014;69(3):179-84.
65. Moreira RP, Bachega TA, Machado MC, Mendonca BB, Bronstein MD, Villares Fragoso MC. Modulatory effect of BclI GR gene polymorphisms on the obesity phenotype in Brazilian patients with Cushing's disease. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*. 2013;68(5):579-85.
66. El-Fayoumi R, Hagra M, Abozenadaha A, Bawazir W, Shinawi T. Association Between NR3C1 Gene Polymorphisms and Toxicity Induced by Glucocorticoids Therapy in Saudi Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2018;19(5):1415-23.
67. 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 and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(1):144-51.
68. van Schoor NM, Dennison E, Lips P, Uitterlinden AG, Cooper C. Serum fasting cortisol in relation to bone, and the role of genetic variations in the glucocorticoid receptor. *Clinical endocrinology*. 2007;67(6):871-8.
69. Goracy I, Goracy J, Safranow K, Skonieczna-Zydecka K, Ciechanowicz A. Association of glucocorticoid receptor gene NR3C1 genetic variants with angiographically documented coronary artery disease and its risk factors. *Archives of medical research*. 2013;44(1):27-33.

70. Savas M, van Rossum EFC. Impact of Glucocorticoid Receptor Polymorphisms on Glucocorticoid Action. Reference Module in Biomedical Sciences: Elsevier; 2018.
71. Cercato C, Halpern A, Frazzatto ES, Guazzelli IC, Villares SM. The N363S polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: effects on visceral fat assessed by abdominal computed tomography. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2009;53(2):288-92.
72. 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 research*. 2016;246:275-83.
73. 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. *Clinical endocrinology*. 2004;61(5):573-81.
74. 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. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2005;19(7):1687-96.
75. 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.
76. van Rossum EF, Binder EB, Majer M, Koper JW, Ising M, Modell S, et al. Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene and major depression. *Biological psychiatry*. 2006;59(8):681-8.
77. van Oosten MJ, Dolhain RJ, Koper JW, van Rossum EF, Emonts M, Han KH, et al. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene that modulate glucocorticoid sensitivity are associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(4):R159.
78. 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. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(7):2800-3.
79. van den Akker EL, Nouwen JL, Melles DC, van Rossum EF, Koper JW, Uitterlinden AG, et al. *Staphylococcus aureus* nasal carriage is associated with glucocorticoid receptor gene polymorphisms. *The Journal of infectious diseases*. 2006;194(6):814-8.
80. Derijk RH, Schaaf MJ, Turner G, Datson NA, Vreugdenhil E, Cidlowski J, et al. A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2001;28(11):2383-8.
81. Rodrigues DM, Reis RS, Dalle Molle R, Machado TD, Mucellini AB, Bortoluzzi A, et al. Decreased comfort food intake and allostatic load in adolescents carrying the A3669G variant of the glucocorticoid receptor gene. *Appetite*. 2017;116:21-8.
82. Bortoluzzi A, Blaya C, da Rosa ED, Paim M, Rosa V, Leistner-Segal S, et al. What can HPA axis-linked genes tell us about anxiety disorders in adolescents? *Trends in psychiatry and psychotherapy*. 2015;37(4):232-7.

3) OBJETIVOS

3.1) Objetivo geral

Determinar a prevalência de polimorfismos do gene do receptor de glicocorticoide relacionados a alteração da sensibilidade glicocorticoide e com potencial impacto na resposta clínica de pacientes com HAC por 21OHD.

3.2) Objetivos específicos

1. Determinar a prevalência dos polimorfismos *BclII* (rs41423247), *N363S* (rs56149945), *Tth IIII* (rs10052957), *ER22/23EK* (rs6190 e rs6189) e *9β* (rs6198), do gene *NR3C1*, estabelecer o perfil genotípico e determinar os haplótipos de pacientes com HAC por 21OHD e comparar com um grupo controle;
2. Comparar a frequência dos polimorfismos com outras populações, de diferentes etnias e ancestralidades;

4) CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foi realizado um estudo do tipo transversal com amostra de conveniência da população de interesse e de um grupo controle.

4.1) Casuística

Todos os pacientes com 21OHD acompanhados no serviço de referência em Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFGM) e adultos egressos deste ambulatório, atualmente acompanhados no Serviço de Endocrinologia do mesmo Hospital, foram convidados a participar do estudo. Foram incluídos os pacientes com HAC na forma clássica que concordaram em participar, assinando o TCLE, entre janeiro e maio de 2016.

O diagnóstico foi baseado em avaliação clínica e bioquímica. Todas as meninas apresentaram genitália ambígua ao nascimento. Nenhum participante tinha outra doença crônica ou recebia medicação regularmente, além da reposição hormonal como terapia para HAC.

A população de interesse foi composta por 102 pacientes com 21OHD, 29 do sexo masculino (28,4%) e 73 do feminino (71,6%), com mediana de 8,95 anos (intervalo interquartil 2,13 a 17,95 anos). Desses, 93,0% dos pacientes tinham a forma perdedora de sal e 7,0% a forma virilizante simples. Os pacientes faziam controle a cada 3 /6 meses, com consultas clínicas e realização de exames laboratoriais; estavam em uso regular de glicocorticoide e de mineralocorticoide, quando indicado, de acordo com o protocolo assistencial.

O grupo controle foi constituído por 163 indivíduos saudáveis, provenientes da mesma população, 58 do sexo masculino (35,6%) e 105 do sexo feminino (64,4%). A mediana de idade foi de 31 anos (intervalo interquartil 27-41 anos). Os critérios de exclusão para este grupo foram: uso de glicocorticoides nos trinta dias anteriores à avaliação, uso de medicamentos contínuos (exceção: anticoncepcional oral) e presença ou passado de doença crônica (anemia grave, neoplasia, doença renal, doença hepática, doença intestinal inflamatória, epilepsia, síndrome de ovários policísticos).

4.2) Métodos

4.2.1) Avaliação genética:

A coleta da amostra de sangue foi realizada no Laboratório Central, do Serviço de Medicina Laboratorial do HC-UFG. Amostras de 5 mL de sangue foram coletadas em tubos à vácuo, com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético), e armazenadas por um período máximo de 7 dias até o processamento em laboratório de pesquisa de referência, na Faculdade de Medicina da UFG.

O material genético foi extraído a partir das amostras de sangue total pelo método convencional de extração salino, desenvolvido por Lahiri e Nurberger em 1991 e modificado por Cavalli em 1996 e posteriormente por Salazar em 1997 (83). A extração de DNA ocorreu em período máximo de uma semana após a coleta do sangue. Em linhas gerais, o método de extração consiste em promover lise dos leucócitos circulantes presentes na amostra de sangue periférico e, assim, isolar o DNA presente no núcleo dessas células, tornando-o disponível para análise posterior. Após isolamento, a concentração de DNA foi determinada por meio do espectrofotômetro NanoVue plus (GE Healthcare).

Os polimorfismos: *N363S* (rs56149945), *Tth IIII* (rs10052957), *ER22/23EK* (rs6189 e rs6190) e *9β* (rs6198) foram genotipados através de ensaios pré-desenhados da TaqMan®, que utilizam tecnologia de discriminação alélica por reação em cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os ensaios utilizados foram: rs56149945: C_26841917_40, rs10052957: C_30158011_10, rs6189: C_175679493_10, rs 6190: C_175679494_10 e rs6198: C_8951023_10.

A determinação do polimorfismo *BclI* (rs41423247) foi realizada por reação em cadeia da polimerase associada com o polimorfismo de fragmentos de DNA obtidos por enzima de restrição (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*; PCR-RFLP), conforme técnica adaptada de um estudo previamente publicado (84).

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 enzima de restrição (Time-Saver™ Bc/I, 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 Bc/I [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 adicionado de 1 µL do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 2% contendo SYBR Safe. A corrida de eletroforese foi realizada a 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). A enzima Bc/I reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...T↓GATCA...'3. Dessa forma, o fragmento contendo o alelo selvagem C em homozigose, quando clivado, gera fragmentos de 267 pb e 151 pb. O fragmento de 418 pb contendo o alelo mutante G em homozigose não apresenta sítio de restrição, permanecendo do mesmo tamanho após a clivagem. O genótipo heterozigoto foi identificado quando da presença dos três fragmentos (418 pb, 267 pb e 151 pb) (Figura 2).

```

TGGCTATTCA AGGTAAGATC AGTGTTTTTT TGTTCCTTAA GAATGGTACA TTTAAGGTAG ATTAATAGAT GTAATCTTTC
ATTGATTAT ATGTGTTCTC TAAAGATTCA TGTGCTTTTT TATATGAATA AGTTAAGTG GCCTTTTGAA AGTAGGAAAG
GTAGACAACC TAAGTGACAT CTGTACGTAA CCATTTTCAGG TTTTTTCCTT AAATAGTGGT TTTCAGTATC CCATTGGCCA
ACGGTGAGGA TTTTATTTAA CATTTTTAAA ATAATGTTGC TCATTAACAG ATATCTTAAC GAAAAATTAT ATAAATTCAG
GAGAGTATAA TGTCTCATAA TATCATATTG TGTGTGTCAT GGTCAATCAG CTGTTTTAGA ATATGTTCTT ATATTACAAT
AAATGATACC CTTACTTACA TAGTCAAAAAG TTGTGCTGCC TTATTTGTAA ATTCGTTAAG TGTTAGCTTG AGATTAAAGA
GTTAAAAGCA GAAGTACTAA CAAAGAGCCC TATTCCTCAA ACTGAATCTT CTGTTAAAGA ATTTGAGTTT TGAAGTTGCT
AAAGCAATGC AGTGAACAGT GTACCAGACC ATAGTATTAG ACACAGGTCT TGCTCACAGG GTTCTTGCCA TAAAGTAGAC
AAGTTATGTC TGCTGATCAA TCTCTTAAAG AGAGGAATTG GTGTCAACAT GGTGCAAAAC AAAATTTTAC GTTCAAATGT
TCCTGCAAGT TCTCAAGTAG ATAAGTATG GCCAAAATTG TTAAGCTTCA ATTTTCAGCT TTCGTTTGAT TTTTCTCTTT
TTTTACTCA GTCGTTTATA AGCATACTGA TATTTTGTGC TGACCCAAAAG AGGTCAGAAA ATGGAATTAT CAGAAAAAAG
TTCTAAATGT AGATATACGT GTTGGTAGGG GTGAATTTCT CTACCCCGTA ACCTCATCCC CAATTGAGAT AAATGCTAGG

```

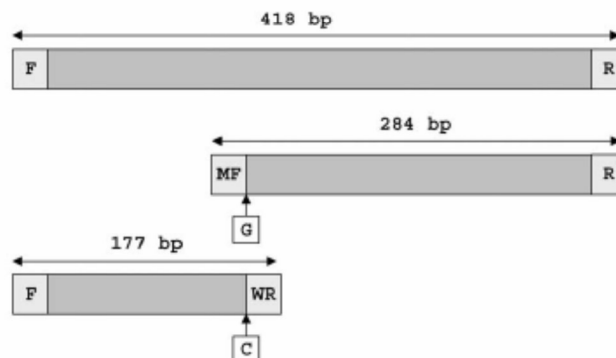


Figura 2. Genotipagem do BclI: A figura superior mostra, em letras maiúsculas, o fragmento correspondente ao final do éxon 2 do gene do receptor de glicocorticoide. O polimorfismo BclI consiste na substituição de C por G, 646 pares de bases a partir do éxon 2 (sublinhado duplo). As sequências sublinhadas 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 horizontais.

4.2.2) Aspectos éticos

O estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP 1.172.019, anexo A). As crianças e adolescentes assinaram o termo de assentimento (TALE) e os adultos participantes, bem como pais ou responsáveis, após informação, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), anexo B.

4.2.3) Análise estatística

Após genotipagem dos pacientes e controles, a frequência de cada polimorfismo foi estabelecida, em valores relativos, através da frequência do alelo menor (FAM). O alelo menor é definido como o segundo alelo mais frequente. Na grande maioria dos casos, ele corresponde ao alelo mutante, enquanto o alelo mais frequente é denominado alelo selvagem. A frequência do alelo menor é expressa em porcentagem, dividindo o número de alelos menores encontrados pelo total de cromossomos analisados.

A distribuição dos genótipos de cada polimorfismo foi avaliada para o equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo programa Genepop, versão 4.7 (<http://cran.r->

project.org.br/web/packages=genepop) (85). A frequência dos polimorfismos foi comparada entre os grupos, pelo teste do qui-quadrado. A distribuição genotípica foi comparada através do odds ratio (OR) e o intervalo de confiança (IC) de 95% foi calculado.

As frequências dos haplótipos e o cálculo do desequilíbrio de ligação (DL), através do cálculo do coeficiente de desequilíbrio padronizado (D') e do *Log of the likelihood odds ratio* (LOD- medida da confiança do valor de D') entre os SNP foram estimados pelo software Haploview, versão 4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) (86). O Haploview estima os haplótipos através de um algoritmo que infere as fases dos haplótipos e gera estimativas de suas frequências populacionais, com base em máxima verossimilhança. O software também calcula o DL. Entre as medidas utilizadas para estabelecer o DL está o LOD, que compara a probabilidade de dois locus estarem verdadeiramente ligados e a probabilidade de se obter os mesmos dados ao acaso (87). O programa considera um $LOD > 2$ como significativo. Outra medida calculada é o D' , usado para descrever a quantidade de DL presente. O DL é representado, na forma tradicional, por um esquema de cores. A cor branca representa um $LOD < 2$ e um $D' < 1$; azul indica $LOD < 2$ e $D' = 1$ e vermelho $LOD \geq 2$ e $D' = 1$ (88).(45)

A determinação dos haplótipos e a comparação da distribuição dos haplótipos entre os grupos foi realizada pelo software Haplostats, versão 1.6.1 1, (<http://cran.r-project.org/web/package/haplo.stats/index.html>) (89). O Haplostats utiliza um algoritmo para estimar os haplótipos, em indivíduos de famílias diferentes, quando a genotipagem dos genitores é desconhecida, através do princípio da máxima verossimilhança. A comparação da frequência dos haplótipos entre os grupos foi realizada pelo OR e o IC de 95% foi determinado. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS

1. Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *The New England journal of medicine*. 2003;349(8):776-88.
2. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010/09/09 ed2010. p. 4133-60.
3. Witchel SF. Congenital Adrenal Hyperplasia. *Journal of pediatric and adolescent gynecology*. 2017;30(5):520-34.
4. Finkelstein GP, Chen W, Mehta SP, Fujimura FK, Hanna RM, Van Ryzin C, et al. Comprehensive genetic analysis of 182 unrelated families with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(1):E161-72.
5. New MI, Abraham M, Gonzalez B, Dumic M, Razzaghy-Azar M, Chitayat D, et al. Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(7):2611-6.
6. Barra CB, Silva IN, Pezzuti IL, Januario JN. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Revista da Associacao Medica Brasileira (1992)*. 2012;58(4):459-64.
7. Therrell BL. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2001;30(1):15-30.
8. Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New MI. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *American journal of human genetics*. 1985;37(4):650-67.
9. El-Maouche D, Arlt W, Merke DP. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet (London, England)*. 2017;390(10108):2194-210.
10. Bruque CD, Delea M, Fernandez CS, Orza JV, Taboas M, Buzzalino N, et al. Structure-based activity prediction of CYP21A2 stability variants: A survey of available gene variations. *Scientific reports*. 2016;6:39082.
11. Turcu AF, Auchus RJ. Adrenal steroidogenesis and congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2015;44(2):275-96.
12. Bidet M, Bellanne-Chantelot C, Galand-Portier MB, Tardy V, Billaud L, Laborde K, et al. Clinical and molecular characterization of a cohort of 161 unrelated women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency and 330 family members. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(5):1570-8.
13. Thil'en A, Nordenstrom A, Hagenfeldt L, von Döbeln U, Guthenberg C, Larsson A. Benefits of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in Sweden. *Pediatrics*. 1998;101(4):E11.
14. Cordeiro GV, Silva IN, Goulart EM, Chagas AJ, Kater CE. Final height in congenital adrenal hyperplasia: the dilemma of hypercortisolism versus hyperandrogenism. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2013;57(2):126-31.
15. Nella AA, Mallappa A, Perritt AF, Gounden V, Kumar P, Sinaii N, et al. A Phase 2 Study of Continuous Subcutaneous Hydrocortisone Infusion in Adults With Congenital Adrenal Hyperplasia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101(12):4690-8.
16. Mooij CF, Webb EA, Claahsen van der Grinten HL, Krone N. Cardiovascular health, growth and gonadal function in children and adolescents with congenital adrenal hyperplasia. *Archives of disease in childhood*. 2017;102(6):578-84.

17. Arlt W, Willis DS, Wild SH, Krone N, Doherty EJ, Hahner S, et al. Health status of adults with congenital adrenal hyperplasia: a cohort study of 203 patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(11):5110-21.
18. Falhammar H, Frisen L, Hirschberg AL, Norrby C, Almqvist C, Nordenskjold A, et al. Increased Cardiovascular and Metabolic Morbidity in Patients With 21-Hydroxylase Deficiency: A Swedish Population-Based National Cohort Study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(9):3520-8.
19. El-Maouche D, Collier S, Prasad M, Reynolds JC, Merke DP. Cortical bone mineral density in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Clinical endocrinology*. 2015;82(3):330-7.
20. Rodrigues TM, Barra CB, Santos JL, Goulart EM, Ferreira AV, Silva IN. Cardiovascular risk factors and increased carotid intima-media thickness in young patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Archives of endocrinology and metabolism*. 2015;59(6):541-7.
21. Sartorato P, Zulian E, Benedini S, Mariniello B, Schiavi F, Bilora F, et al. Cardiovascular risk factors and ultrasound evaluation of intima-media thickness at common carotids, carotid bulbs, and femoral and abdominal aorta arteries in patients with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(3):1015-8.
22. Claahsen-van der Grinten HL, Otten BJ, Hermus AR, Sweep FC, Hulsbergen-van de Kaa CA. Testicular adrenal rest tumors in patients with congenital adrenal hyperplasia can cause severe testicular damage. *Fertility and sterility*. 2008;89(3):597-601.
23. Volkl TM, Simm D, Beier C, Dorr HG. Obesity among children and adolescents with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics*. 2006;117(1):e98-105.
24. Auchus RJ, Arlt W. Approach to the patient: the adult with congenital adrenal hyperplasia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(7):2645-55.
25. Volkl TM, Simm D, Dotsch J, Rascher W, Dorr HG. Altered 24-hour blood pressure profiles in children and adolescents with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(12):4888-95.
26. Choi JH, Yoo HW. Management issues of congenital adrenal hyperplasia during the transition from pediatric to adult care. *Korean journal of pediatrics*. 2017;60(2):31-7.
27. Jenkins-Jones S, Parviainen L, Porter J, Withe M, Whitaker MJ, Holden SE, et al. Poor compliance and increased mortality, depression and healthcare costs in patients with congenital adrenal hyperplasia. *European journal of endocrinology*. 2018;178(4):309-20.
28. Galon J, Franchimont D, Hiroi N, Frey G, Boettner A, Ehrhart-Bornstein M, et al. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002;16(1):61-71.
29. Longui CA, Faria CD. Evaluation of glucocorticoid sensitivity and its potential clinical applicability. *Hormone research*. 2009;71(6):305-9.
30. Lightman SL, Conway-Campbell BL. The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nature reviews Neuroscience*. 2010;11(10):710-8.
31. Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2016;42(1):15-31, vii.
32. Song QQ, Xie WY, Tang YJ, Zhang J, Liu J. Genetic variation in the glucocorticoid pathway involved in interindividual differences in the glucocorticoid treatment. *Pharmacogenomics*. 2017;18(3):293-316.
33. Faria CD, Longui CA. [Molecular aspects of glucocorticoid sensitivity]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2006;50(6):983-95.
34. 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.

35. Zhang Z, Burch PE, Cooney AJ, Lanz RB, Pereira FA, Wu J, et al. Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. *Genome research*. 2004;14(4):580-90.
36. Stahn C, Lowenberg M, Hommes DW, Buttgereit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Molecular and cellular endocrinology*. 2007;275(1-2):71-8.
37. Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocrine reviews*. 1996;17(3):245-61.
38. Quinkler M, Oelkers W, Diederich S. Clinical implications of glucocorticoid metabolism by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases in target tissues. *European journal of endocrinology*. 2001;144(2):87-97.
39. Chapman K, Holmes M, Seckl J. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action. *Physiological reviews*. 2013;93(3):1139-206.
40. Lamberts SW, Huizenga AT, de Lange P, de Jong FH, Koper JW. Clinical aspects of glucocorticoid sensitivity. *Steroids*. 1996;61(4):157-60.
41. 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. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(1):47-54.
42. 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. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(10):5804-10.
43. van Rossum EF, Lamberts SW. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent progress in hormone research*. 2004;59:333-57.
44. Manenschijn L, van den Akker EL, Lamberts SW, van Rossum EF. Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms. An overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1179:179-98.
45. Koper JW, van Rossum EF, van den Akker EL. Glucocorticoid receptor polymorphisms and haplotypes and their expression in health and disease. *Steroids*. 2014;92:62-73.
46. Koetz KR, van Rossum EF, Ventz M, Diederich S, Quinkler M. BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with increased bone resorption in patients on glucocorticoid replacement therapy. *Clinical endocrinology*. 2013;78(6):831-7.
47. Li H, Su G, Jiang L, Bao Z. An efficient unified model for genome-wide association studies and genomic selection. *Genetics, selection, evolution : GSE*. 2017;49(1):64.
48. Palmer C, Pe'er I. Statistical correction of the Winner's Curse explains replication variability in quantitative trait genome-wide association studies. *PLoS genetics*. 2017;13(7):e1006916.
49. The Genomes Project C. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526:68.
50. Weiss KM, Clark AG. Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. *Trends in genetics : TIG*. 2002;18(1):19-24.
51. Syed AA, Irving JA, Redfern CP, Hall AG, Unwin NC, White M, et al. Low prevalence of the N363S polymorphism of the glucocorticoid receptor in South Asians living in the United Kingdom. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(1):232-5.
52. Murray JC, Smith RF, Ardinger HA, Weinberger C. RFLP for the glucocorticoid receptor (GRL) located at 5q11-5q13. *Nucleic acids research*. 1987;15(16):6765.
53. Fleury I, Beaulieu P, Primeau M, Labuda D, Sinnett D, Krajcinovic M. Characterization of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene. *Clinical chemistry*. 2003;49(9):1528-31.

54. Tremblay A, Bouchard L, Bouchard C, Despres JP, Drapeau V, Perusse L. Long-term adiposity changes are related to a glucocorticoid receptor polymorphism in young females. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(7):3141-5.
55. Zopf K, Frey KR, Kienitz T, Ventz M, Bauer B, Quinkler M. BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor and adrenal crisis in primary adrenal insufficiency. *Endocrine connections*. 2017;6(8):685-91.
56. Kaymak Cihan M, Karabulut HG, Yurur Kutlay N, Ilgin Ruhi H, Tukun A, Olcay L. Association Between N363S and BclI Polymorphisms of the Glucocorticoid Receptor Gene (NR3C1) and Glucocorticoid Side Effects During Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment. *Turkish journal of haematology : official journal of Turkish Society of Haematology*. 2017;34(2):151-8.
57. Boyle B, Koranyi K, Patocs A, Liko I, Szappanos A, Bertalan R, et al. Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene in Graves ophthalmopathy. *The British journal of ophthalmology*. 2008;92(1):131-4.
58. Herrera C, Marcos M, Carbonell C, Miron-Canelo JA, Espinosa G, Cervera R, et al. Association between allelic variants of the human glucocorticoid receptor gene and autoimmune diseases: A systematic review and meta-analysis. *Autoimmunity reviews*. 2018;17(5):449-56.
59. Moreira RP, Gomes LG, Mendonca 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.
60. Vitellius G, Trabado S, Bouligand J, Delemer B, Lombes M. Pathophysiology of Glucocorticoid Signaling. *Annales d'endocrinologie*. 2018;79(3):98-106.
61. Souza MC, Martins CS, Silva-Junior IM, Chriguer RS, Bueno AC, Antonini SR, et al. NR3C1 polymorphisms in Brazilians of Caucasian, African, and Asian ancestry: glucocorticoid sensitivity and genotype association. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2014;58(1):53-61.
62. Moreira RPP, Gomes LG, Madureira G, Mendonca BB, Bachega TASS. Influence of the A3669G Glucocorticoid Receptor Gene Polymorphism on the Metabolic Profile of Pediatric Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia. *International Journal of Endocrinology*. 2014;2014:594710.
63. Martins CS, Elias D, Colli LM, Couri CE, Souza MC, Moreira AC, et al. HPA axis dysregulation, NR3C1 polymorphisms and glucocorticoid receptor isoforms imbalance in metabolic syndrome. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2017;33(3).
64. Maciel GA, Moreira RP, Bugano DD, Hayashida SA, Marcondes JA, Gomes LG, et al. Association of glucocorticoid receptor polymorphisms with clinical and metabolic profiles in polycystic ovary syndrome. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*. 2014;69(3):179-84.
65. Moreira RP, Bachega TA, Machado MC, Mendonca BB, Bronstein MD, Villares Frago MC. Modulatory effect of BclI GR gene polymorphisms on the obesity phenotype in Brazilian patients with Cushing's disease. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*. 2013;68(5):579-85.
66. El-Fayoumi R, Hagra M, Abozenadaha A, Bawazir W, Shinawi T. Association Between NR3C1 Gene Polymorphisms and Toxicity Induced by Glucocorticoids Therapy in Saudi Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2018;19(5):1415-23.
67. 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 and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(1):144-51.
68. van Schoor NM, Dennison E, Lips P, Uitterlinden AG, Cooper C. Serum fasting cortisol in relation to bone, and the role of genetic variations in the glucocorticoid receptor. *Clinical endocrinology*. 2007;67(6):871-8.

69. Goracy I, Goracy J, Safranow K, Skonieczna-Zydecka K, Ciechanowicz A. Association of glucocorticoid receptor gene NR3C1 genetic variants with angiographically documented coronary artery disease and its risk factors. *Archives of medical research*. 2013;44(1):27-33.
70. Savas M, van Rossum EFC. Impact of Glucocorticoid Receptor Polymorphisms on Glucocorticoid Action. Reference Module in Biomedical Sciences: Elsevier; 2018.
71. Cercato C, Halpern A, Frazzatto ES, Guazzelli IC, Villares SM. The N363S polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: effects on visceral fat assessed by abdominal computed tomography. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2009;53(2):288-92.
72. 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 research*. 2016;246:275-83.
73. 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. *Clinical endocrinology*. 2004;61(5):573-81.
74. 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. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2005;19(7):1687-96.
75. 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.
76. van Rossum EF, Binder EB, Majer M, Koper JW, Ising M, Modell S, et al. Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene and major depression. *Biological psychiatry*. 2006;59(8):681-8.
77. van Oosten MJ, Dolhain RJ, Koper JW, van Rossum EF, Emonts M, Han KH, et al. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene that modulate glucocorticoid sensitivity are associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(4):R159.
78. 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. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(7):2800-3.
79. van den Akker EL, Nouwen JL, Melles DC, van Rossum EF, Koper JW, Uitterlinden AG, et al. Staphylococcus aureus nasal carriage is associated with glucocorticoid receptor gene polymorphisms. *The Journal of infectious diseases*. 2006;194(6):814-8.
80. Derijk RH, Schaaf MJ, Turner G, Datson NA, Vreugdenhil E, Cidlowski J, et al. A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2001;28(11):2383-8.
81. Rodrigues DM, Reis RS, Dalle Molle R, Machado TD, Mucellini AB, Bortoluzzi A, et al. Decreased comfort food intake and allostatic load in adolescents carrying the A3669G variant of the glucocorticoid receptor gene. *Appetite*. 2017;116:21-8.
82. Bortoluzzi A, Blaya C, da Rosa ED, Paim M, Rosa V, Leistner-Segal S, et al. What can HPA axis-linked genes tell us about anxiety disorders in adolescents? *Trends in psychiatry and psychotherapy*. 2015;37(4):232-7.
83. Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Machado MO, Hirata RD. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clinical chemistry*. 1998;44(8 Pt 1):1748-50.
84. Gergics P, Patocs A, Majnik J, Balogh K, Szappanos A, Toth M, et al. Detection of the Bcl I polymorphism of the glucocorticoid receptor gene by single-tube allele-specific polymerase chain reaction. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2006;100(4-5):161-6.
85. Rousset F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources*. 2008;8(1):103-6.

86. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2005;21(2):263-5.
87. Lewontin RC. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. *Genetics*. 1964;49(1):49-67.
88. Andrade ESd. Desequilíbrio de ligação e blocos de haplótipos determinados pela análise de 250k SNPs em três remanescentes de quilombos. Ribeirão Preto 2013.
89. Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE, Jacobson RM, Poland GA. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *American journal of human genetics*. 2002;70(2):425-34.

ANEXOS

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



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: Termo de consentimento livre e esclarecido

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, será realizada uma consulta médica e uma única coleta de sangue (10 mL) no início da pesquisa para a realização de exames laboratoriais, como os que ele(a) já realiza habitualmente para o controle. 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

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:

.....

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 IGUAL OU
SUPERIOR A 18 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, será realizada uma consulta médica e uma única coleta de sangue (10 mL) no início da pesquisa para a realização de exames laboratoriais, como os que você já realiza habitualmente para o controle. 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:

Assinatura:

.....

5) ARTIGO

INTRODUÇÃO

A hiperplasia adrenal congênita (HAC) secundária a deficiência da enzima 21 α -hidroxilase (21OHD) é uma doença autossômica recessiva, que leva a diminuição da secreção de cortisol e deficiência mineralocorticoide, com consequente aumento da produção de andrógenos no córtex adrenal (1). Está relacionada a mutações no gene CYP21A2, que codifica a 21 α -hidroxilase, e representa aproximadamente 95% das deficiências enzimáticas adrenais (2, 3).

A 21OHD pode se apresentar nas formas clássica e não clássica, de acordo com o grau de deficiência enzimática. A forma clássica perdedora de sal é causada por mutações que inativam completamente o CYP21A2, reduzindo tanto a síntese de cortisol quanto de aldosterona. Já na forma clássica virilizante simples, 1-2% de função da enzima 21OH é mantida, e a produção mínima de aldosterona evita o quadro de perda de sal nos pacientes (1).

A reposição de glicocorticoide (GC), por toda a vida, é a base do tratamento da 21 OHD na forma clássica. Na forma perdedora de sal é necessário, ainda, repor mineralocorticoide. Uma das dificuldades do tratamento é encontrar a dose adequada de GC para inibir o excesso de produção androgênica, mas que não seja excessiva e capaz de provocar efeitos adversos, o que na prática constitui um desafio (4, 5). Na infância e adolescência o glicocorticoide de escolha é a hidrocortisona. Sua meia-vida mais curta minimiza os efeitos colaterais dos glicocorticoides mais potentes e de ação mais prolongada, principalmente a supressão do crescimento (6). A dose necessária varia entre os pacientes, o que pode ser atribuído a fatores como: formulação da medicação, diferenças na absorção e meia-vida do GC, aumento do *clearance* de cortisol na puberdade (7) e adesão ao tratamento (8). Além desses fatores, evidências tem sugerido que existiria um set point para a sensibilidade glicocorticoide, provavelmente geneticamente determinado (9).

Os glicocorticoides são moduladores em uma variedade de sistemas fisiológicos e têm um papel importante na homeostase, tanto no metabolismo basal quanto no estresse. Aproximadamente 20% dos genes expressos nos leucócitos humanos são regulados positiva ou negativamente pelos glicocorticoides (10). Têm um papel crítico nos

processos biológicos como crescimento, reprodução, metabolismo intermediário, reações imunes e inflamatórias, assim como nas funções cardiovasculares e do sistema nervoso central. Agem através da ligação aos seus receptores. Os receptores de glicocorticoide (GR) são membros da superfamília de receptores nucleares e estão presentes virtualmente em todas as células. São codificados pelo gene *NR3C1*, localizado no braço longo do cromossomo 5 (5q31). Este gene possui aproximadamente 150.000 pares de base e é composto por 9 éxons (11). Um *splicing* alternativo no éxon 9 gera duas isoformas altamente homólogas do receptor, denominadas α e β . O GR α reside em sua maioria no citoplasma, migra para o núcleo quando ligado, e representa o clássico GR que funciona como um fator de transcrição dependente do ligante. O GR β , por outro lado, não se liga ao cortisol, podendo ou não se ligar aos glicocorticoides sintéticos. Apresenta uma atividade transcricional independente do GR α e exerce, sobre a atividade deste último, um efeito dominante negativo (12). Outras variantes do GR já foram descritas: GR γ , que exibe aproximadamente 50% da atividade do GR α e GR-A e GR-P, que não se ligam aos glicocorticoides e pouco se sabe sobre suas funções biológicas (13).

Entre os possíveis fatores que poderiam determinar a sensibilidade aos glicocorticoides estão os polimorfismos (SNPs) do gene *NR3C1* (14). Além dessa ação, eles também têm sido associados a diferenças na composição corporal, parâmetros metabólicos, doenças cardiovasculares (15) e desordens psiquiátricas (16). Mais de 3000 SNPs já foram descritos até o momento, a maior parte deles em íntrons e regiões não traduzidas (17). Apesar dos mecanismos não estarem completamente elucidados, os polimorfismos levam a modificações na transcrição gênica, tanto na quantidade quanto na função codificadora (17, 18). Os mais estudados até o momento, e associados à sensibilidade aos glicocorticoides, são: *BclI*, *ThI*, *ER22/23EK*, *N363S* e *9 β* (19). Entre estes, o *BclI* e o *N363S* foram relacionados a maior sensibilidade, enquanto o *ThI*, o *ER22/23EK* e *9 β* a maior resistência (17).

Os SNPs não apresentam distribuição randômica em uma população. Quando estão no mesmo cromossomo, são herdados em combinações, os haplótipos, que tem sido usados nos estudos de associação para aumentar a sensibilidade de detecção de múltiplos efeitos na mesma região gênica (20).

Diante das evidências de que os polimorfismos do gene *NR3C1* estão associados a alteração da sensibilidade glicocorticoide, o objetivo do presente estudo foi avaliar a

prevalência de polimorfismos funcionais desse gene, com potencial impacto na resposta clínica, em pacientes com HAC por 21OHD, comparados com um grupo controle.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Sujeitos

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP 1.172.019) e os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para serem incluídos. As crianças e adolescentes com 21 OHD foram recrutados do de serviço de referência em Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). Os adultos com 21OHD, egressos deste ambulatório, e atualmente em acompanhamento no serviço de Endocrinologia do mesmo Hospital, também foram convidados a participar do estudo.

A população de interesse foi composta de 102 pacientes, com idade de 8,95 anos (IQ 2,13 - 17,95), com 21OHD na forma clássica, em acompanhamento e tratamento regulares. O diagnóstico foi baseado em avaliação clínica e bioquímica. Todas as meninas apresentaram genitália ambígua ao nascimento. A maior parte dos pacientes (93,0%) apresentava a forma perdedora de sal e 7,0% a forma virilizante simples; 71,6% (73) eram do sexo feminino e 28,4% (29) do sexo masculino. Nenhum participante tinha outra doença crônica ou recebia medicação regularmente, além da reposição hormonal como terapia para HAC.

O grupo controle foi constituído por 163 indivíduos saudáveis, provenientes da mesma população, sendo 58 do sexo masculino (35,6%) e 105 do sexo feminino (64,4%). A mediana de idade foi de 31 anos (IQ 27- 41). Foram excluídos indivíduos com presença ou passado de doenças crônicas, uso de medicação contínua e uso de glicocorticoide nos trinta dias que antecederam a avaliação.

Genotipagem

O DNA foi isolado do sangue periférico pelo método de extração salino (21). Todos os pacientes e controles foram genotipados para os polimorfismos *N363S*, *Tth IIII*, *ER22/23EK*, *9β* e *BclI*.

Os polimorfismos *N363S* (rs56149945), *Tth IIII* (rs10052957), *ER22/23EK* (rs6189 e rs6190) e *9β* (rs6198) foram genotipados através de ensaios pré-desenhados da

TaqMan®, que utilizam tecnologia de discriminação alélica por reação em cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os ensaios utilizados foram: rs56149945: C_26841917_40, rs10052957: C_30158011_10, rs6189: C_175679493_10, rs 6190: C_175679494_10 e rs6198: C_8951023_10.

A determinação do polimorfismo *BclI* (rs41423247) foi realizada por reação em cadeia da polimerase, associada com polimorfismo de fragmentos de DNA obtidos por enzima de restrição (*polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism*; PCR-RFLP), conforme técnica adaptada de estudo previamente publicado (22). De maneira simplificada, o produto da amplificação da PCR foi digerido por uma enzima de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%.

Análise estatística

A distribuição dos genótipos de cada polimorfismo foi avaliada para o equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo programa Genepop, versão 4.7 (<http://cran.r-project.org/web/packages=genepop>) (23). A frequência dos polimorfismos, mensurada pela frequência do alelo menor (FAM), foi comparada entre os grupos pelo teste do qui-quadrado. A distribuição genotípica foi comparada através do cálculo do odds ratio (OR), com intervalo de confiança (IC) de 95%. A significância estatística foi estabelecida em 5%.

Análise dos haplótipos

O software Haploview, versão 4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) (24) foi utilizado para os cálculos das frequências dos haplótipos e do desequilíbrio de ligação (DL), realizado através do coeficiente de desequilíbrio padronizado (D') e do LOD (*Log of the likelihood odds ratio* - medida da confiança do valor de D'), entre os SNPs. A comparação da distribuição dos haplótipos entre os grupos foi realizada pelo software Haplostats, versão 1.6.1 1, (<http://cran.r-project.org/web/package/haplo.stats/index.html>) (25); foi calculado o OR, com IC de 95%.

RESULTADOS

Todos os polimorfismos avaliados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não foram encontradas diferenças significativas nas frequências dos polimorfismos entre pacientes e controles (Tabela 1).

Tabela 1: Frequências dos polimorfismos nos pacientes com 21OHD e nos controles

POLIMORFISMO	PACIENTES FAM (%) n: 102	CONTROLES FAM (%) (n)	χ^2	p
<i>ER22/23EK</i> (rs6189)	2,5	1,3 (157)	0,904	0,3417
<i>ER22/23EK</i> (rs6190)	2,5	3,3 (152)	0,300	0,5842
<i>9β</i> (rs6198)	16,2	11,6 (153)	2,202	0,1378
<i>N363S</i> rs56149945	0,5	1,7 (160)	1,414	0,2345
<i>Tht IIII</i> (rs10052957)	32,8	25,8 (116)	2,931	0,0869
<i>BclI</i> (rs41423247)	26,0	32,7 (139)	2,561	0,1095

FAM: Frequência do alelo menor χ^2 : qui-quadrado

Na comparação dos genótipos, o polimorfismo *Tht IIII* em heterozigose (GA) foi mais frequente nos pacientes (OR 2,186; p=0,004), enquanto o o *BclI*, também em heterozigose (CG), foi mais prevalente nos controles (OR 0,581; p=0,049) (Tabela 2).

Observou-se que os pacientes apresentaram maior DL entre os polimorfismos estudados. O DL foi maior entre o *9 β* e o *ER22/23EK* e entre o *9 β* e o *Tht IIII* em ambos os grupos. No grupo controle foi demonstrado, ainda, um forte DL entre o *9 β* e o *BclI I* (Figura 1).

Tabela 2: Distribuição dos polimorfismos nos pacientes com 21OHD e nos controles

GENÓTIPOS OU ALELOS	PACIENTES (n=102, %)	CONTROLES (n=163, %)	ODDS RATIO (IC 95%)	p-valor
rs6189 C>T (ER22/23EK)				
CC	97 (95)	153 (94)	1,0	-
CT	5 (5)	4 (2)	1,971 (0,517-7,524)	0,320
TT	-	-	-	-
C	198 (98)	306 (94)	1,0	-
T	5 (2)	4 (1)	1,922 (0,509-7,245)	0,334
rs6190 C>T (ER22/23EK)				
CC	97 (95)	148 (91)	1,0	-
CT	5 (5)	4 (2)	1,907 (0,499-7,280)	0,345
TT	-	-	-	-
C	199 (98)	302 (92)	1,0	-
T	5 (2)	4 (1)	1,884 (0,499-7,103)	0,349
rs6198 T>C (9β)				
CC	71 (70)	121 (74)	1,0	-
TC	29 (28)	29 (18)	0,587 (0,324-1,061)	0,078
CC	2 (2)	3 (2)	1,136 (0,185-6,964)	0,890
T	171 (84)	271 (83)	1,0	-
C	33 (16)	35 (11)	1,494 (0,895-2,495)	0,125
rs10052957 G>A (Th1 IIII)				
GG	43 (42)	94 (58)	1,0	-
GA	51 (50)	51 (31)	2,186 (1,287-3,714)	0,004*
AA	8 (8)	15 (9)	1,166 (0,459-2,957)	0,747
G	137 (67)	239 (73)	1,0	-
A	67 (33)	81 (25)	1,443 (0,981-2,122)	0,060
rs56149945 T>C (N363S)				
TT	101 (99)	114 (70)	1,0	-
TC	1 (1)	4 (2)	0,282 (0,031-2,566)	0,261
CC	-	-	-	-
T	203 (99)	232 (71)	1,0	-
C	1 (1)	4 (1)	0,286 (0,032-2,577)	0,264
rs41423247 C>G (BclII)				
CC	57 (56)	60 (37)	1,0	-
CG	37 (36)	67 (41)	0,581 (0,338-0,998)	0,049*
GG	8 (8)	12 (7)	0,702 (0,267-1,842)	0,472
C	151 (74)	187 (57)	1,0	-
G	53 (26)	91 (28)	0,721 (0,483-1,077)	0,110

IC: intervalo de confiança; *p<0,05

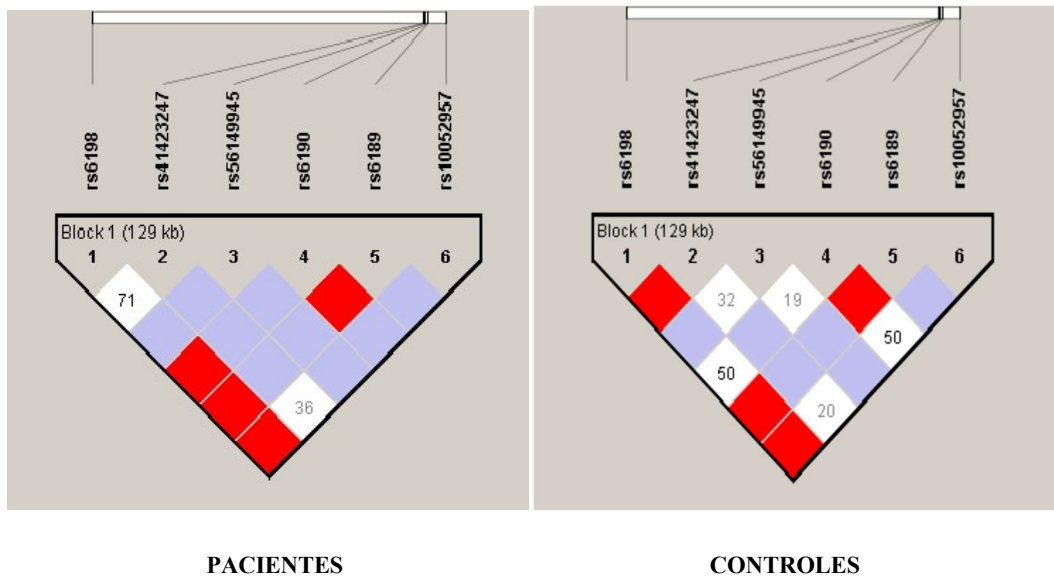


Figura 1: Desequilíbrio de ligação (DL) entre os polimorfismos do gene *NR3C1* nos grupos estudados. Os polimorfismos estão identificados pelo seu número de identificação (“rs#”). Os números nos quadrados indicam o D' e estão expressos em percentagens. Os quadrados em vermelho indicam SNP com grande DL, com valores de LOD \geq 2, os azuis LOD $<$ 2 e D' = 1 e os brancos LOD $<$ 2 e D' $<$ 1.

Foram gerados seis haplótipos com frequência maior do que 1%, cuja distribuição é apresentada na tabela 3. Excluindo o haplótipo selvagem (sem nenhum polimorfismo), o mais presente nos controles, com diferença estatisticamente significativa, foi o que contém apenas o polimorfismo *BclII*, com frequência de 19,9% versus 11,3% nos pacientes (OR:0,56, $p=0,017$). Nos pacientes, os haplótipos contendo os polimorfismos *BclII* e *ThtIII* e os polimorfismos 9β e *ThtIII* foram os mais frequentes, sem atingir diferença estatisticamente significativa em comparação aos controles. O haplótipo contendo o polimorfismo *ThtIII* e o haplótipo com 9β , *ThtIII* e *ER22/23EK* foram os menos encontrados nos dois grupos.

Tabela 3: Distribuição dos haplótipos

Haplótipo	Polimorfismo (s)	Frequência pacientes (%)	Frequência controles (%)	Odds ratio	IC	p- valor
TCTCCG	Selvagem	55,3	53,0	1,00	---	0,80
TGTCCG	<i>BclII</i>	11,3	19,9	0,56	0,31-0,99	0,017*
TGTCCA	<i>BclII</i> + <i>ThtIII</i>	13,2	11,9	1,01	0,58-1,77	0,70
CCTCCA	9β + <i>ThtIII</i>	12,3	9,9	1,30	0,70-2,39	0,22
TCTCCA	<i>ThtIII</i>	3,4	2,1	1,64	0,46-5,86	0,28
CCTTTA	9β + <i>ER22/23EK</i> + <i>ThtIII</i>	2,5	1,2	1,19	0,40-3,53	---

IC: Intervalo de confiança; * $p < 0,05$

DISCUSSÃO

Dentro do nosso conhecimento, a maior prevalência do polimorfismo *Tth IIII* em heterozigose (GA) nos pacientes com 21OHD e do polimorfismo *BclI* (CG), também em heterozigose, nos controles, foi relatada pela primeira vez em nosso estudo. Dos SNPs avaliados, estes são os de maior frequência. O *TthIIII* foi o de maior prevalência, 32,8%, e não havia sido relatada sua frequência na população brasileira anteriormente. Ele se caracteriza pela substituição de citosina por timina, 6305 pares de bases a partir do primeiro códon de iniciação, em um íntron (17), e tem sido associado, além da resistência glicocorticoide, à um perfil metabólico mais saudável. O *BclI*, que consiste na substituição de citosina por guanina (C>G) no íntron 2 (26), teve frequência de 26,0% nos pacientes, próximo ao relatado em estudos prévios que avaliaram a população brasileira, em torno de 25% (15, 27), incluindo pacientes com 21OHD (28). Está relacionado, além da maior sensibilidade glicocorticoide, a alterações de humor, psicopatologias, hipertensão arterial, síndrome metabólica e, especialmente, hiperinsulinemia e obesidade. Em pacientes com 21OHD sua presença estaria relacionada a necessidade de doses menores de glicocorticoide (29).

Na avaliação dos haplótipos, ficou evidenciado maior prevalência do haplótipo “T, G, T, C, C, G”, que possui apenas o polimorfismo *BclI*, nos controles. Este dado, também não descrito anteriormente, sugere maior sensibilidade glicocorticoide em indivíduos saudáveis quando comparados aos pacientes com 21OHD estudados. A avaliação por haplótipos têm demonstrado maior poder do que à avaliação dos SNPs isolados na determinação dos fenótipos de doenças complexas e produtos gênicos, especialmente no campo da farmacogenética, no qual já está estabelecido que variações nas respostas a drogas podem ser atribuídas a variações genéticas (20).

Devido à baixa taxa de recombinação entre as 150.000kb do gene *NR3C1* e ao grande desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos, haplótipos contendo diferentes combinações de SNPs já foram descritos. Em estudo realizado em Rotterdam, Holanda, que avaliou 10.000 indivíduos com patologias diversas, incluindo artrite reumatoide, diabetes, câncer, doença arterial coronariana e crianças nascidas pequenas para a idade gestacional, e determinou os mesmos polimorfismos do presente estudo, foram identificados seis haplótipos principais com frequências semelhantes as encontrados em nossa casuística: selvagem: 42%; *BclI* 23%; *BclI* e *Tth IIII* 14%; *9β* e *Tth IIII* 14%; *9β*, ER22/23EK e *Tth IIII* 2,5% e *N363S* 4,5% (17). A exceção foi o haplótipo que contém

apenas o polimorfismo *N363S*, que não foi encontrado em nosso estudo, o que pode ser atribuído a baixa prevalência deste SNP em nossa população. A frequência do haplótipo contendo apenas o *BclI*, foi semelhante ao que encontramos nos controles, 19,9%, mas superior ao encontrado nos pacientes, 11,3%.

O genótipo GA do SNP *Tht IIII* foi encontrado em 51 dos 102 pacientes. Este SNP foi originalmente associado a resistência glicocorticoide. Contudo, outros estudos sugeririam que ele não tem efeito autônomo, e sim, que seu efeito resulta da associação com outros polimorfismos (30), especialmente o *9β*, combinação encontrada em 12,3% dos pacientes e com o *ER22/23EK*, encontrado em conjunto com o *9β* e o *Tht IIII* em 2,5% dos pacientes. Estes dados sugerem que parcela significativa dos pacientes com HAC por 21OHD avaliados pode apresentar resistência glicocorticoide, o que pode ter impacto no tratamento, uma vez que, o hipercortisolismo está associado a um perfil cardiovascular e metabólico desfavorável e ao hipogonadismo secundário e o hiperandrogenismo, por outro lado, também pode afetar a saúde cardiovascular, o crescimento e a fertilidade (31).

Na comparação com o projeto 1000 Genomas, ficou evidenciado que a prevalência da maior parte dos polimorfismos: *ER22/23EK*, *9β* e *Tht IIII* foi semelhante ao encontrado na população europeia (32) (Tabela 4). Esse achado reforça estudo da ancestralidade brasileira realizado previamente, que demonstrou que, em todas as regiões do Brasil, a ancestralidade europeia é predominante, com proporções variando de 60,6% no Nordeste a 77,7% no Sul. Na região Sudeste, origem da maior parte dos pacientes e controles, as proporções genômicas encontradas neste estudo foram: 74,2% europeia, 17,3% africana e 7,3% ameríndia (33). O projeto 1000 Genomas, apesar de ser um banco de dados robusto, que é referência atualmente, por ter caracterizado um amplo espectro de variações genéticas, de diferentes ancestralidades, não é representativo de todas as populações. A população brasileira, por exemplo, não foi avaliada, e as populações selecionadas para compor o banco de dados da América, que não refletem a ancestralidade brasileira, foram: Peru, Colômbia, México e Porto Rico.

Tabela 4: Frequência dos polimorfismos nos pacientes com 21OHD e no Projeto 1000 Genomas

POLIMORFISMO	FREQUÊNCIA (%) (n: 102)	1000 GENOMAS (%) (n:5008)	EUROPA (%) (n:1006)	ÁFRICA (%) (n:1322)	AMÉRICA (%) (n:694)	SUL ÁSIA (%) (n:978)	LESTE ÁSIA (%) (n:1008)
<i>ER22/23EK</i> (rs6189/rs6190)	2,5	1,06	2,98	NE*	0,58	1,84	0,1
<i>9β</i> (rs6198)	16,2	8,3	17,4	2,3	9,5	15,0	0,1
<i>N363S</i> rs56149945	0,5	0,6	1,79	0,08	1,15	0,4	NE*
<i>Tht IIII</i> (rs10052957)	32,8	22,1	32,1	26,6	20,4	17,6	11,8
<i>BclI</i> (rs41423247)	26,0	25,4	37,9	20,0	26,3	20,5	24,2

*Não encontrado

Na comparação com estudos que avaliaram a população brasileira, a frequência do *N363S*, de 0,5%, assim como a do *BclI*, foi semelhante ao descrito previamente. As frequências, nos estudos prévios, variaram entre 0 e 2,2% (27, 34) e, em 68 pacientes com 21 OHD, foi encontrado em apenas um deles, em heterozigose (29). O SNP *N363S*, que se localiza no códon 363 do éxon 2, consiste na substituição de adenina por guanina (AAT→ AGT), o que resulta na troca de asparagina para serina (35). Sua presença foi associada a aumento do índice de massa corporal (IMC) (36), maiores níveis de insulina (37) e a prevalências aumentadas de diabetes mellitus tipo 2 e doença coronariana (38).

A frequência do polimorfismo *ER22/23EK*, de 2,5%, foi superior. Ele está localizado no domínio de transcrição do éxon 2, nos códons 22 e 23. São mutações de nucleotídeo único e estão sempre associadas. A primeira mutação é silenciosa, alterando o códon 22 de GAG para GAA, ambos codificando ácido glutâmico. A segunda, no códon 23, de AGG para AAG, resulta na tradução de lisina no lugar de arginina (35, 39). Nos estudos prévios com a população brasileira sua prevalência máxima foi de 2,2% (27, 34) e, em 68 pacientes com 21OHD, foi encontrado em apenas um deles, em heterozigose (29). O polimorfismo *9β*, que consiste na substituição de adenina por guanina e está localizado no éxon 9, foi encontrado com frequência de 16,2%, dentro do intervalo descrito em outros estudos, de 9,0 a 18,3% (40), mas superior ao descrito em pacientes com 21OHD, nos quais a frequência foi de 9,6 e 9,7% (28). Esses polimorfismos, assim como o *Tht IIII*, além de terem sido associados a maior resistência glicocorticoide,

também foram associados a um perfil metabólico mais saudável: os portadores do *ER22/23EK* apresentaram níveis plasmáticos mais baixos de colesterol total, LDL e insulina no jejum, maior sensibilidade a insulina e menor risco de diabetes mellitus tipo 2 (41); a presença do *9β* foi associada a menores níveis plasmáticos de colesterol total, maiores níveis de HDL e menor risco de obesidade em mulheres (42) e o *Tht IIII*, quando presente em conjunto com o *ER22/23EK*, foi relacionado a níveis mais baixos de insulina e LDL colesterol (30).

CONCLUSÃO

O presente estudo traz evidências de que o polimorfismo *ThtIIII* em heterozigose (GA) é mais frequente nos pacientes com HAC por 21OHD, o que poderia estar associado à resistência glicocorticoide, enquanto o polimorfismo *BclI*, também em heterozigose (CG), é mais frequente no grupo controle, o que estaria relacionado a maior sensibilidade glicocorticoide. Outro achado concordante foi a maior prevalência do haplótipo “T, G, T, C, C, G”, que possui apenas o polimorfismo *BclI*, nos controles. Em conjunto, esses dados sugerem que uma parcela dos pacientes com HAC por 21OHD poderia apresentar algum grau de resistência aos glicocorticoides e, conseqüentemente, necessitar de doses mais elevadas do que o estabelecido baseado na população saudável, para o controle do seu quadro. Novos estudos podem definir o uso da genotipagem para permitir uma maior individualização do tratamento.

REFERÊNCIAS

1. Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *The New England journal of medicine*. 2003;349(8):776-88.
2. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010/09/09 ed2010. p. 4133-60.
3. Witchel SF. Congenital Adrenal Hyperplasia. *Journal of pediatric and adolescent gynecology*. 2017;30(5):520-34.
4. Cordeiro GV, Silva IN, Goulart EM, Chagas AJ, Kater CE. Final height in congenital adrenal hyperplasia: the dilemma of hypercortisolism versus hyperandrogenism. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2013;57(2):126-31.
5. Nella AA, Mallappa A, Perritt AF, Gounden V, Kumar P, Sinaii N, et al. A Phase 2 Study of Continuous Subcutaneous Hydrocortisone Infusion in Adults With Congenital Adrenal Hyperplasia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101(12):4690-8.
6. Bonfig W, Bechtold S, Schmidt H, Knorr D, Schwarz HP. Reduced final height outcome in congenital adrenal hyperplasia under prednisone treatment: deceleration of growth velocity during puberty. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(5):1635-9.
7. 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. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2018;103(11):4043-88.
8. Jenkins-Jones S, Parviainen L, Porter J, Withe M, Whitaker MJ, Holden SE, et al. Poor compliance and increased mortality, depression and healthcare costs in patients with congenital adrenal hyperplasia. *European journal of endocrinology*. 2018;178(4):309-20.
9. 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. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(10):5804-10.
10. Galon J, Franchimont D, Hiroi N, Frey G, Boettner A, Ehrhart-Bornstein M, et al. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002;16(1):61-71.
11. Song QQ, Xie WY, Tang YJ, Zhang J, Liu J. Genetic variation in the glucocorticoid pathway involved in interindividual differences in the glucocorticoid treatment. *Pharmacogenomics*. 2017;18(3):293-316.
12. 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.
13. Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2016;42(1):15-31, vii.
14. Longui CA, Faria CD. Evaluation of glucocorticoid sensitivity and its potential clinical applicability. *Hormone research*. 2009;71(6):305-9.
15. Maciel GA, Moreira RP, Bugano DD, Hayashida SA, Marcondes JA, Gomes LG, et al. Association of glucocorticoid receptor polymorphisms with clinical and metabolic profiles in polycystic ovary syndrome. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*. 2014;69(3):179-84.
16. Schote AB, Jager K, Kroll SL, Vonmoos M, Hulka LM, Preller KH, et al. Glucocorticoid receptor gene variants and lower expression of NR3C1 are associated with cocaine use. *Addiction biology*. 2018.
17. Koper JW, van Rossum EF, van den Akker EL. Glucocorticoid receptor polymorphisms and haplotypes and their expression in health and disease. *Steroids*. 2014;92:62-73.

18. Koetz KR, van Rossum EF, Ventz M, Diederich S, Quinkler M. BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with increased bone resorption in patients on glucocorticoid replacement therapy. *Clinical endocrinology*. 2013;78(6):831-7.
19. Manenschijn L, van den Akker EL, Lamberts SW, van Rossum EF. Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms. An overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1179:179-98.
20. Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annual review of medicine*. 2005;56:303-20.
21. Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Machado MO, Hirata RD. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clinical chemistry*. 1998;44(8 Pt 1):1748-50.
22. Gergics P, Patocs A, Majnik J, Balogh K, Szappanos A, Toth M, et al. Detection of the Bcl I polymorphism of the glucocorticoid receptor gene by single-tube allele-specific polymerase chain reaction. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2006;100(4-5):161-6.
23. Rousset F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources*. 2008;8(1):103-6.
24. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2005;21(2):263-5.
25. Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE, Jacobson RM, Poland GA. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *American journal of human genetics*. 2002;70(2):425-34.
26. Murray JC, Smith RF, Ardinger HA, Weinberger C. RFLP for the glucocorticoid receptor (GRL) located at 5q11-5q13. *Nucleic acids research*. 1987;15(16):6765.
27. Martins CS, Elias D, Colli LM, Couri CE, Souza MC, Moreira AC, et al. HPA axis dysregulation, NR3C1 polymorphisms and glucocorticoid receptor isoforms imbalance in metabolic syndrome. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2017;33(3).
28. Moreira RPP, Gomes LG, Madureira G, Mendonca BB, Bachega TASS. Influence of the A3669G Glucocorticoid Receptor Gene Polymorphism on the Metabolic Profile of Pediatric Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia. *International Journal of Endocrinology*. 2014;2014:594710.
29. Moreira RP, Gomes LG, Mendonca 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.
30. 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. *Clinical endocrinology*. 2004;61(5):573-81.
31. Mooij CF, Webb EA, Claahsen van der Grinten HL, Krone N. Cardiovascular health, growth and gonadal function in children and adolescents with congenital adrenal hyperplasia. *Archives of disease in childhood*. 2017;102(6):578-84.
32. The Genomes Project C. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526:68.
33. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PloS one*. 2011;6(2):e17063.
34. Souza MC, Martins CS, Silva-Junior IM, Chriguer RS, Bueno AC, Antonini SR, et al. NR3C1 polymorphisms in Brazilians of Caucasian, African, and Asian ancestry: glucocorticoid sensitivity and genotype association. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2014;58(1):53-61.
35. El-Fayoumi R, Hagra M, Abozenadaha A, Bawazir W, Shinawi T. Association Between NR3C1 Gene Polymorphisms and Toxicity Induced by Glucocorticoids Therapy in Saudi Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2018;19(5):1415-23.

36. van Schoor NM, Dennison E, Lips P, Uitterlinden AG, Cooper C. Serum fasting cortisol in relation to bone, and the role of genetic variations in the glucocorticoid receptor. *Clinical endocrinology*. 2007;67(6):871-8.
37. 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 and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(1):144-51.
38. Goracy I, Goracy J, Safranow K, Skonieczna-Zydecka K, Ciechanowicz A. Association of glucocorticoid receptor gene NR3C1 genetic variants with angiographically documented coronary artery disease and its risk factors. *Archives of medical research*. 2013;44(1):27-33.
39. 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. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2005;19(7):1687-96.
40. Rodrigues DM, Reis RS, Dalle Molle R, Machado TD, Mucellini AB, Bortoluzzi A, et al. Decreased comfort food intake and allostatic load in adolescents carrying the A3669G variant of the glucocorticoid receptor gene. *Appetite*. 2017;116:21-8.
41. 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.
42. Vitellius G, Trabado S, Bouligand J, Delemer B, Lombes M. Pathophysiology of Glucocorticoid Signaling. *Annales d'endocrinologie*. 2018;79(3):98-106.