

RICARDO PARANHOS PIRES MOREIRA

**Análise de fatores genéticos associados ao
desenvolvimento da síndrome metabólica durante a
terapia com glicocorticoide em pacientes portadores da
deficiência da 21-hidroxilase**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa: Ciências Médicas
Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo
Orientadora: Profa. Dra. Tânia Aparecida Sartori
Sanchez Bachega

São Paulo
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Moreira, Ricardo Paranhos Pires

Análise de fatores genéticos associados ao desenvolvimento da síndrome metabólica durante a terapia com glicocorticoide em pacientes portadores da deficiência da 21-hidroxilase / Ricardo Paranhos Pires Moreira. -- São Paulo, 2014.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientadora: Tânia Aparecida Sartori Sanchez Bachega.

Descritores: 1.Hiperplasia suprarrenal congênita 2.Obesidade 3.Síndrome metabólica 4.Polimorfismo genético 5.Receptor de glucocorticoides 6.11 Beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1 7.Glucocorticoides

USP/FM/DBD-066/14

Dedico esta tese aos meus pais, Helenita e Roberto, que, no decorrer da minha vida, proporcionaram-me os conhecimentos da integridade, da perseverança e da honestidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus por esta importante conquista em minha carreira e por amparar-me nos momentos difíceis, dar-me força interior para superar as dificuldades e por mostrar-me os caminhos nas horas incertas.

À minha mentora Profa. Tânia Bachega, que, além de ser uma orientadora muito presente, foi uma grande conselheira nestes últimos anos. Quanto maior foi meu convívio com a Profa. Tânia, maior foi minha admiração, pois sua dedicação e competência, somadas à sua humildade, são contagiantes.

À Profa. Berenice Mendonça, por ter me acolhido no LIM 42 e pelos conselhos e ensinamentos ao longo deste período. À Profa. Ana Cláudia Latronico, pelas importantes sugestões.

Aos pacientes com a deficiência da 21-hidroxilase, que proporcionaram a execução deste projeto.

À equipe da 21-hidroxilase: Laura Kaupert, Vivian Moura e Marilene Pacheco, pelas conversas e troca de experiências. À Dra. Larissa Gomes, pelos ensinamentos e conselhos. À Dra. Guiomar Madureira, pelo acompanhamento dos pacientes no ambulatório médico.

Aos amigos do LIM 42 pela convivência. Cito os Drs. Alexander Jorge e Vinícius Nahime pelos conselhos e ensinamentos em bioestatística. À Dra. Maria Cândida, pela parceria em trabalhos envolvendo pacientes com Doença de Cushing. Agradeço à Nilda e à Rosangele, pelo auxílio, dedicação e zelo com os colaboradores do LIM 42. Agradeço à Cristina Rossi, pelas amostras de DNA e pelas boas risadas. À Dra. Mirian Nishi, pelo apoio nos processos do

laboratório. À Mariana Funari, pela ajuda durante o período de bancada. À Valéria Lando, por sua energia positiva. À Cidinha, pelos ensinamentos de pipetagem e à Fran, por manter o ambiente sempre organizado.

Agradeço aos meus amigos da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, pelo apoio incondicional durante a execução desta tese.

Agradeço o meu grande amigo Saulo Fernandes de Andrade, por seus importantes conselhos e constante incentivo.

Em especial, agradeço aos meus pais, Helenita e Roberto, e minha irmã, Rita de Cássia, que são os meus grandes alicerces, pelo eterno cuidado, dedicação e amor; pelo apoio nos momentos difíceis e de inquietantes decisões, por estarem ao meu lado em cada passo, a cada conquista, pois estas não teriam valor se vocês não estivessem comigo.

A minha noiva Deyse Cardoso da Silva, pela paciência e abdicação do tempo de convívio, em prol da realização deste projeto. À Deyse, o meu amor, minha admiração e meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

Às instituições de apoio à pesquisa, que viabilizaram a execução desta tese de doutorado. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio de bolsa individual no início do projeto (processo 2009/54238-2) e pelo apoio de bancada por meio do projeto de apoio à pesquisa (processo 2009/54394-4). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio de bolsa individual.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein (1879 – 1955)

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	14
RESUMO.....	16
SUMMARY.....	19
1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Hiperplasia Adrenal Congênita por Deficiência da 21-Hidroxilase – Considerações Iniciais.....	2
1.1.1 Tratamento da Deficiência da 21-Hidroxilase	6
1.1.2 Complicações da Terapia da Deficiência da 21-Hidroxilase.....	8
1.1.3 Obesidade	8
1.1.4 Perfil Lipídico	9
1.1.5 Resistência à Insulina.....	10
1.1.6 Hipertensão	11
1.2 O Cortisol na Etiologia da Síndrome Metabólica	12
1.3 Genes Relacionados à Variabilidade Individual na Biodisponibilidade e/ou Ação Periférica do Glicocorticoide.....	13
1.3.1 Enzima 11 β -Hidroxiesteroido Desidrogenase Tipo I	14
1.3.2 Receptor de Glicocorticoide	15
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS.....	21
4. MÉTODOS	23
4.1 Pacientes.....	24
4.2 Critérios de Inclusão.....	24

4.3 Critério Diagnóstico para Síndrome Metabólica	25
4.4 Dosagens Hormonais	26
4.5 História Familiar dos Componentes da Síndrome Metabólica.....	26
4.6 Dose de Glicocorticoide.....	27
4.7 Amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase	27
4.7.1 Gene Codificador da Enzima 21-Hidroxilase (<i>CYP21A2</i>).....	28
4.7.2 Gene Codificador do Receptor de Glicocorticoide (<i>NR3C1</i>).....	28
4.7.3 Gene Codificador da Enzima 11 β -Hidroxiesteroidoide Desidrogenase Tipo 1 (<i>HSD11B1</i>)	32
4.8 Estudo por Sequenciamento de DNA.....	32
4.9 Análise Estatística	33
5. RESULTADOS.....	35
5.1 Marcadores Clínicos e Bioquímicos do Risco Metabólico em Crianças e Adolescentes com 21-OHD	36
5.1.1 Impacto dos Polimorfismos nos Genes <i>NR3C1</i> e <i>HSD11B1</i> Sobre o Perfil Metabólico de Crianças e Adolescentes com 21-OHD.....	40
5.2 Marcadores Clínicos e Bioquímicos do Risco Metabólico em Adultos com 21-OHD	45
5.2.1 Impacto dos Polimorfismos nos Genes <i>NR3C1</i> e <i>HSD11B1</i> Sobre o Perfil Metabólico de Adultos com 21-OHD	50
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÕES	68
8. REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICE.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esteroidogênese adrenal.....	2
Figura 2 – Estrutura do gene que codifica a enzima 11BHSD1 e localização do polimorfismo ins4436A.....	15
Figura 3 – Estrutura do gene NR3C1 que codifica o receptor de glicocorticoide e localização dos polimorfismos ER22/23EK, N363S, Bcl e A3669G (representado por GR-9β).....	17
Figura 4 – Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na detecção dos polimorfismos dos genes NR3C1 e HSD11B1.....	29
Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose de produto de PCR aleloespecífico para pesquisa do polimorfismo Bcl – NCR3C1.....	30
Figura 6 – Comparação da dose de GC entre pacientes jovens obesos, sobrepeso e com peso normal.....	37
Figura 7 – Comparação entre a frequência dos componentes da síndrome metabólica entre os pacientes jovens obesos e não obesos com 21-OHD.	38
Figura 8 – Comparação da história familiar para obesidade, hipertensão, diabetes, dislipidemia e doença cardiovascular entre pacientes jovens obesos e não obesos com 21-OHD.	40
Figura 9 – Comparação da dose de GC entre pacientes adultos obesos, sobrepeso e com peso normal.....	47
Figura 10 – Comparação da frequência dos componentes da síndrome metabólica entre os adultos obesos e não obesos com 21-OHD de acordo com os critérios do NCEP ATPIII	48

Figura 11 – História familiar dos componentes da síndrome metabólica entre os adultos obesos e não obesos com 21-OHD..... 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas e antropométricas das crianças e adolescentes com a deficiência da 21-hidroxilase.....	36
Tabela 2 – Comparação do perfil clínico e metabólico entre pacientes jovens portadores das formas perdedora de sal e virilizante simples da 21-OHD..	39
Tabela 3 – Frequência alélica das variantes dos genes <i>NR3C1</i> e <i>HSD11B1</i> nas crianças e adolescentes com 21-OHD e nas populações Caucásiana, Africana e Asiática.....	41
Tabela 4 – Influência do polimorfismo <i>BclI</i> sobre o perfil metabólico de pacientes jovens com a deficiência da 21-hidroxilase.....	42
Tabela 5 – Influência do polimorfismo A3669G sobre o perfil metabólico de pacientes jovens com a deficiência da 21-hidroxilase.....	43
Tabela 6 – Influência do polimorfismo 4436InsA sobre o perfil metabólico de pacientes jovens com a deficiência da 21-hidroxilase.....	44
Tabela 7 – Características clínicas e antropométricas de 68 adultos com a deficiência da 21-hidroxilase.....	45
Tabela 8 – Comparação do perfil clínico e metabólico entre pacientes adultos portadores das formas Perdedora de Sal (PS) e Virilizante Simples (VS) da 21-OHD	49
Tabela 9 – Frequência alélica das variantes encontradas nos genes <i>NR3C1</i> e <i>HSD11B1</i> em adultos com 21-OHD e nas populações Caucásiana, Africana e Asiática.....	51
Tabela 10 – Influência do polimorfismo <i>BclI</i> sobre o perfil metabólico de pacientes adultos com a deficiência da 21-hidroxilase.....	52

Tabela 11 – Impacto do polimorfismo A3669G sobre o perfil metabólico de pacientes com a deficiência da 21-hidroxilase..... 53

Tabela 12 – Impacto do polimorfismo 4436InsA sobre o perfil metabólico de pacientes adultos com a deficiência da 21-hidroxilase..... 54

LISTA DE ABREVIATURAS

21-OHD	Deficiência da 21-Hidroxilase
PS	Forma Clássica Perdedora de Sal
VS	Forma Clássica Virilizante Simples
NC	Forma Não Clássica
17OHP	17-Hidroxi-progesterona
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
POR	Proteína P450 óxido-redutase
STAR	Proteína Reguladora da Esteroidogênese
NADPH	Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
11 β HSD1	Enzima 11 β -Hidroxiesteróide Desidrogenase Tipo 1
<i>HDS11B1</i>	Gene Codificador da Enzima 11 β -Hidroxiesteróide Desidrogenase Tipo 1
NR3C1	Gene Codificador do Receptor de Glicocorticoide
CYP21A2	Gene Codificador da Enzima 21-Hidroxilase
P450c21	Enzima 21-Hidroxilase
P450c17	Enzima 17 α -Hidroxilase
GC	Glicocorticoide
HHA	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
SM	Síndrome Metabólica
IMC	Índice de Massa Corporal
HOMA	<i>Homeostatic model assessment</i>

HDL-c	Lipoproteína de Alta Densidade
LDL-c	Lipoproteína de Baixa Densidade
TG	Triglicérides
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PAD	Pressão Arterial Diastólica
UV	Luz Ultravioleta
TAE	Tampão Tris-Aacetato-EDTA
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pb	Pares de Bases Nucleotídicas

RESUMO

Moreira RPP. Análise de fatores genéticos associados ao desenvolvimento da síndrome metabólica durante a terapia com glicocorticoide em pacientes portadores da deficiência da 21-hidroxilase [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introdução: A deficiência da 21-hidroxilase (21-OHD) é um frequente erro herdado do metabolismo que resulta no comprometimento da síntese do cortisol e/ou aldosterona e aumento da produção de andrógenos. A doença é caracterizada por uma diversidade fenotípica, variando desde virilização pré-natal da genitália externa de fetos femininos e pós-natal em ambos os sexos, com ou sem perda de sal, até quadros assintomáticos. Em seu tratamento é necessária reposição com glicocorticoide para se evitar a insuficiência adrenocortical e os sinais de virilização. Um fino ajuste na dose diária do glicocorticoide é essencial para se evitar sub ou supertratamento, com o objetivo de preservar o potencial de estatura final e fertilidade. Entretanto, tem sido observada maior frequência de obesidade e outras comorbidades metabólicas nestes pacientes; porém, a prevalência destas complicações ainda não é conhecida, bem como se estariam associadas à exposição ao glicocorticoide e/ou com fatores genéticos. **Objetivos:** avaliar a frequência de obesidade e de síndrome metabólica (SM) em pacientes com 21-OHD; caracterizar a distribuição alélica dos polimorfismos dos genes do receptor de glicocorticoide (*NR3C1*) e da enzima 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo I (*HSD11B1*), e correlacionar a distribuição destes polimorfismos com a presença das complicações metabólicas. **Métodos:** Foram selecionados 109 pacientes (60 PS/49 VS), sendo 41 crianças e adolescentes (idade média $11,4 \pm 3,9$ anos) e 68 adultos (idade média $28,4 \pm 9$ anos) em tratamento com glicocorticoide e com adequado controle hormonal. Pacientes com a forma PS também receberam fludrocortisona. Adequado controle foi caracterizado por concentração normal de atividade plasmática de renina e de andrógenos de acordo com o sexo e idade nos últimos 2 anos. A obesidade nos adultos foi definida pelo IMC ≥ 30 kg/m² e em crianças e adolescentes pelo IMC acima do percentil 95. Síndrome metabólica foi definida segundo o critério do *National Cholesterol Education Program* em adultos e crianças. História familiar de hipertensão arterial, diabetes, dislipidemia, obesidade e/ou doença cardiovascular também foi avaliada. Foram mensuradas glicemia, lipoproteínas, triglicérides, colesterol total e insulina. Os alelos *Bcl*, A3669G, ER22/23EK e N363S do gene *NR3C1* e o alelo 4436InsA do gene *HSD11B1* foram genotipados e as análises de associação com os fenótipos foram

realizadas por meio dos testes Chi-quadrado, *t*-studant e análise de regressão. As análises de correlação foram feitas utilizando o teste de correlação de Pearson.

Resultados: Obesidade foi observada em 31,7% das crianças e 23,5% dos adultos. Síndrome metabólica foi observada em 14,6% das crianças e 7,3% dos adultos. A prevalência dos componentes da SM foi maior no grupo dos obesos quando comparada a de pacientes não obesos (crianças e adultos). Não houve correlação significante entre o IMC, sexo, forma clínica da 21-OHD, duração da terapia e dose de GC. História familiar positiva para obesidade, hipertensão, dislipidemia e doença cardiovascular foi mais frequente nos pacientes obesos quando comparada a de pacientes não obesos, em adultos e crianças. Os polimorfismos *BclI*, A3669G e 4436InsA foram identificados em 23,2%, 9,7% e 14,6% dos alelos das crianças, respectivamente, e nos adultos em 26,4%, 9,6% e 18,4% dos alelos, respectivamente. A variante A3669G foi associada à maiores concentrações de LDL-c em crianças quando comparada aos carreadores do alelo selvagem. Os pacientes adultos carreadores do polimorfismo *BclI* apresentaram maior IMC, circunferência abdominal e PAS quando comparados aos carreadores do alelo selvagem. Não observamos diferenças estatisticamente significantes no perfil metabólico entre pacientes carreadores e não carreadores do polimorfismo 4436InsA (adultos e crianças). **Conclusão:** observamos que pacientes 21-OHD possuem maior prevalência de obesidade, e o grupo pediátrico maior prevalência de SM em relação à população de referência, sendo ambas independentes da dose de glicocorticoide e do tempo do tratamento. A presença de perfil metabólico adverso esteve associada à obesidade e à predisposição genética, tais como história familiar e variantes genéticas do receptor de glicocorticoide.

Descritores: 1. Hiperplasia suprarrenal congênita 2. Obesidade 3. Síndrome Metabólica 4. Polimorfismo genético 5. Receptor de glucocorticoides 6. 11 Beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1 7. Glucocorticoides

SUMMARY

Moreira RPP. Analysis of genetic factors associated with the development of the metabolic syndrome during therapy with glucocorticoids in patients with 21-hydroxylase deficiency [thesis], School of Medicine, University of São Paulo, SP (Brazil); 2013.

Introduction: Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency (21-OHD) is a common autosomal recessive disorder that leads to decreased glucocorticoid secretion, with or without mineralocorticoid deficiency, and increased androgen production. The disease is characterized by phenotypic variability, including a severe form with prenatal virilization of the external genitalia in female fetuses and postnatal virilization in both sexes, with or without salt loss. Current therapy aims to provide adequate glucocorticoid (GC) replacement and to suppress the abnormal androgen secretion; mineralocorticoid replacement aims to control the renal salt balance to avoid adrenal crisis. Nevertheless, these therapeutic goals are difficult to achieve in practice due to the complexity of replicating the physiologic cortisol circadian rhythm. Increased prevalence of obesity, insulin resistance, hypertension and adverse lipid profile have been observed among CAH patients under GC therapy; however, the extent of its prevalence and also whether it is associated with the GC dose or with genetic factors are not known. **Objectives:** to evaluate the obesity and metabolic syndrome (SM) frequencies in 21-OHD patients; to characterize the allelic distribution of the *NR3C1* and *HSD11B1* polymorphisms, and to correlate with the metabolic profile. **Methods:** One hundred and nine patients (60SW/49SV) were selected, 41 being children and adolescents (mean age 11.4 ± 3.9 yrs) and 68 adults (mean age 28.4 ± 9 yrs) all of whom received GC treatment and had adequate hormonal control. SW patients also received fludrocortisone. Adequate hormonal control was characterized by normal plasmatic rennin activity and androgen levels according to age and sex for at least two years. Blood fasting was used to obtain glucose, lipoproteins, triglycerides, total cholesterol and insulin levels. Obesity in the adult group was defined by $BMI \geq 30$ kg/m^2 , and in the young group by $BMI > 95^{\text{th}}$ percentile. Metabolic syndrome was defined by the NCEP ATP III criteria. Family history of the hypertension, diabetes, dyslipidemia, obesity and/or cardiovascular disease was also evaluated. The *BclI*, A3669G, ER22/23EK and N363S alleles of the *NR3C1* gene and 4436InsA of the *HSD11B1* gene were genotyped and association analyses with phenotype were carried out with Chi-square, *t*-test and regression analysis. Correlation analyses were performed by Pearson correlation test. **Results:** obesity was observed in 31.7% of children and 23.5% of adults. SM was observed in 14.6% of young and

7.3% of adult patients. SM prevalence was higher in the obese group than the non-obese group (children and adults). There was no significant correlation between GC dose and BMI, sex, clinical form or treatment duration. Prevalence of family history of obesity, hypertension, dyslipidemia and cardiovascular disease was higher in the obese than in non-obese patients (children and adults). The *BclI*, A3669G and 4436InsA polymorphisms were found in 23.2%, 9.7% and 14.6% of the alleles in children, respectively and in 26.4%, 9.6% and 18.4% of the alleles in adults. The A3669G variant was associated to increased LDL-c levels in comparison with non-carriers in the young group. The *BclI* adult carriers presented higher BMI, abdominal circumference and systolic blood pressure in comparison with non-carriers. Statistically significant differences were not observed in the metabolic profile between carriers and non-carriers of the 4436InsA polymorphism (children and adults). **Conclusion:** in the present study, which analyzed the clinical and metabolic profile of 21-OHD patients, high obesity prevalence, independent of GC dose and treatment duration, was observed. Adverse metabolic profile was mainly associated with obesity and genetic predisposition, such as family history and *NR3C1* polymorphisms.

Descriptors: 1. Congenital adrenal hyperplasia 2. Obesity 3. Metabolic syndrome
4. Polymorphism 5. Glucocorticoid receptor 6. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 7. Glucocorticoids

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hiperplasia Adrenal Congênita por Deficiência da 21-Hidroxilase – Considerações Iniciais

O córtex da glândula adrenal produz três principais tipos de hormônios esteroides: glicocorticoides, mineralocorticoides e esteroides sexuais. A síntese dos esteroides ocorre a partir de um precursor comum, o colesterol, que sofre sucessivas reações de hidroxilação, mediadas, principalmente, por monoxigenases da superfamília dos citocromos P450 (Figura 1) (1).

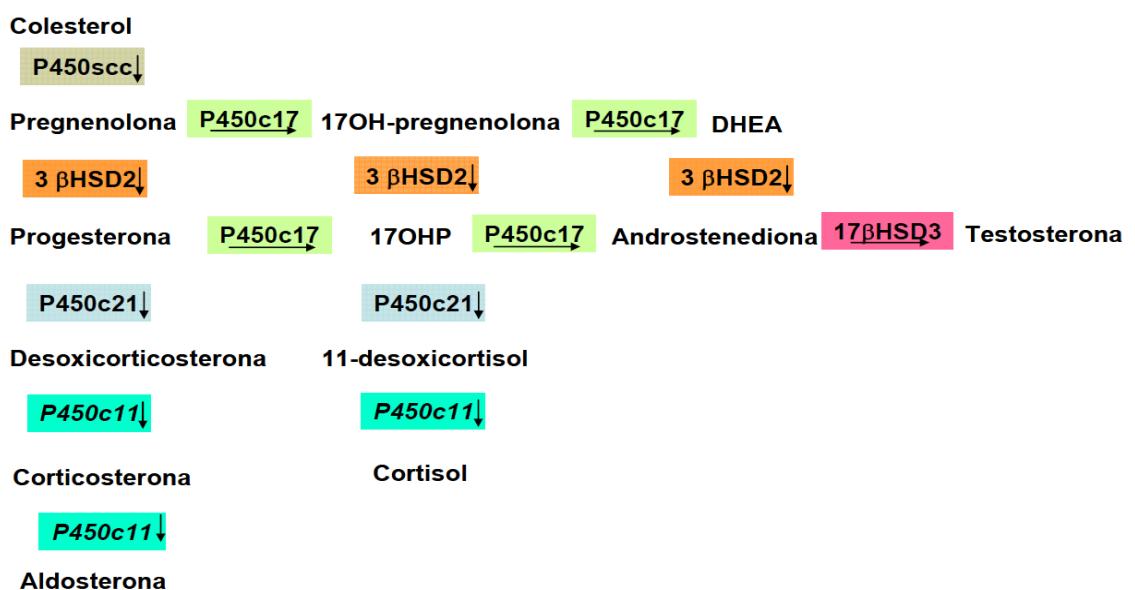


Figura 1 – Esteroidogênese adrenal. P450 scc, P450 *side-chain cleavage* ou 20-22 colesterol desmolase; P450c17, 17 α -hidroxilase e 17,20-liase; 3 β HSD2, 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo II; 17 β HSD3, 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo III, DHEA, dehidroepiandrosterona, P450c21, 21-hidroxilase; 17OHP, 17-hidroxiprogesterona; P450c11, 11 β -hidroxilase.

A regulação da esteroidogênese é realizada tanto por fatores circulantes que agem à distância do sítio de síntese, como o sistema CRH- ACTH-cortisol, como por fatores intracelulares, como a atividade das

enzimas esteroidogênicas, cuja eficiência catalítica é regulada pela transferência de elétrons.

O principal hormônio glicocorticoide (GC) é o cortisol, para sua síntese são necessárias as seguintes enzimas: 20-22 colesterol desmolase, 3- β hidroxiesteróide desidrogenase, 17- α hidroxilase, 21-hidroxilase e 11- β hidroxilase. A deficiência de qualquer uma dessas enzimas leva ao comprometimento da produção de cortisol e como consequência origina um grupo de doenças denominado por hiperplasia adrenal congênita.

A hiperplasia adrenal congênita é uma doença genética de herança autossômica recessiva, causada por mutações em um dos cinco genes codificadores das enzimas envolvidas na síntese do cortisol ou no gene da proteína reguladora da esteroidogênese (STAR) ou no gene do transportador de elétrons P450 óxido-redutase (POR). A proteína STAR controla o transporte do colesterol para a membrana mitocondrial interna, o qual é um passo limitante da esteroidogênese. A proteína POR é responsável pela transferência de elétrons do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) para todas as enzimas microssomais P450, incluindo as enzimas da esteroidogênese P450c17, P450aro e P450c21, sendo esse passo essencial para atividade dessas enzimas (2).

A forma mais comum de hiperplasia adrenal congênita, responsável por 90-95% dos casos, é causada por mutações no gene CYP21A2 que codifica a enzima 21-hidroxilase. Esta enzima pertence à família dos citocromos P450 microssomais, ou seja, localizada no retículo endoplasmático liso. A 21-hidroxilase converte progesterona em

desoxicorticosterona e a 17-hidroxiprogesterona (17OHP) em 11-desoxicortisol, que por sua vez é convertido em cortisol sob ação da 11-hidroxilase. A diminuição da atividade da 21-hidroxilase causa diminuição da produção de cortisol e resulta em estimulação crônica do córtex adrenal pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e, consequentemente, causa hiperplasia adrenal e superprodução dos precursores do cortisol. Estes precursores são desviados para a biossíntese dos andrógenos causando os sinais de virilização característicos desta doença (3).

Os programas de rastreamentos neonatais sugerem frequência da forma clássica em 1:10.000 a 1:18.000 nascimentos na maioria das populações caucasianas, podendo variar de acordo com o grupo étnico (4, 5). Dados de frequência na população dos Estados de São Paulo e Goiás mostram uma incidência aproximada de 1:10.000 nascimentos. Por outro lado, a forma não clássica apresenta frequência bem mais elevada, ocorrendo em 1 a 2% da população caucasiana (6, 7).

Na deficiência da 21-hidroxilase existe uma variedade de manifestações fenotípicas, as quais em geral são classificadas em basicamente nos fenotípicos, descritos a seguir: a forma clássica, que inclui as formas perdedora de sal (PS) e virilizante simples (VS), e a forma não clássica (NC), que inclui as formas sintomática e críptica (8).

A forma clássica virilizante simples caracteriza-se pela presença de virilização pré-natal da genitália externa no sexo feminino. As concentrações elevadas dos andrógenos adrenais na vida intrauterina interagem com o receptor androgênico da pele da genitália e podem impedir a formação

separada dos canais vaginal e uretral. Ocorre também aumento do clitóris e fusão variável das pregas lábio-escrotais. Este grau de virilização da genitália pode causar erros na identificação do sexo ao nascimento. No sexo masculino não ocorrem malformações da genitália, mas pode ser observada macrogenitossomia ao nascimento. Sem tratamento na vida pós-natal, os sinais de virilização progridem em ambos os sexos, causando aumento do clitóris ou pênis, pubarca precoce, aumento da velocidade de crescimento e fechamento precoce das epífises ósseas, resultando em baixa estatura final. Nos meninos, na maior parte dos casos, a macrogenitossomia chama a atenção dos familiares entre os três e sete anos de idade, porém nesta faixa etária os pacientes já apresentam importante avanço da idade óssea.

A forma perdedora de sal comprehende aproximadamente 75% dos casos da forma clássica. Caracteriza-se pela hiperprodução androgênica semelhante ao que encontramos na forma virilizante simples e por grave deficiência da produção de aldosterona, resultando em desidratação com hiponatremia e hiperpotassemia e quando não tratada leva ao óbito. A crise de perda de sal ocorre geralmente no primeiro mês de vida (9, 10). Não é infrequente, na história familiar de meninas com a forma perdedora de sal, relatos de irmãos que faleceram no período neonatal. A ausência de alteração evidente da genitália externa do sexo masculino ao nascimento deve contribuir para a falta do diagnóstico e morte pela crise de perda de sal.

Na forma não clássica sintomática, as meninas nascem com genitália externa normal. As manifestações podem iniciar na infância, adolescência ou na vida adulta. Na infância, o quadro se caracteriza por pubarca precoce e

avanço da maturação óssea, podendo resultar em comprometimento da estatura final, porém com menor intensidade do que o causado pela forma clássica. Na adolescência ou na vida adulta, o quadro se caracteriza por amenorréia primária ou secundária, irregularidade menstrual, hirsutismo, acne e infertilidade.

A forma críptica apresenta o mesmo perfil hormonal da forma sintomática, porém sem as manifestações clínicas, sendo geralmente diagnosticada na investigação dos familiares de um parente afetado.

Em resumo, a deficiência da 21-hidroxilase deve sempre ser pesquisada em casos com ambiguidade genital, “meninos” sem gônadas palpáveis, desidratação neonatal com hiponatremia e hiperpotassemia, pubarca precoce, hirsutismo, irregularidade menstrual, infertilidade e até mesmo na presença de incidentaloma adrenal. O diagnóstico hormonal é realizado com dosagens da 17OH-progesterona e suas concentrações basais estão muito elevadas na forma clássica, geralmente maiores do que 50 ng/mL (7). Na forma não clássica, o critério utilizado é o valor da 17OH-progesterona maior do que 10 ng/mL após estímulo agudo com ACTH sintético (11).

1.1.1 Tratamento da Deficiência da 21-Hidroxilase

O tratamento da hiperplasia adrenal congênita por deficiência da 21-hidroxilase baseia-se na reposição de glicocorticoide em “doses fisiológicas” para todas as formas clínicas e de mineralocorticoide para a forma perdedora de sal. A terapia tem como objetivos evitar a crise de insuficiência

adrenal, controlar o hiperandrogenismo sem afetar a velocidade de crescimento, permitir adequada maturação óssea e desenvolvimento puberal e, preservar o potencial da estatura final e da fertilidade (12). Contudo, o tratamento apresenta características peculiares de acordo com o período do desenvolvimento, as quais serão descritas a seguir.

O glicocorticoide de escolha para pacientes em fase de crescimento é o acetato de hidrocortisona (10 – 15 mg/m²/dia) devido a sua meia vida curta, dessa forma minimizando a supressão do crescimento e demais efeitos deletérios dos glicocorticoides mais potentes, como a dexametasona e prednisona. Recentemente na literatura, também tem sido observado bons resultados com o uso da prednisolona (13, 14). O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo disponibiliza o acetato de cortisona (18 – 20 mg/m²/dia), que também apresenta meia vida curta e é convertido para cortisol no fígado.

No seguimento clínico, a dose do glicocorticoide deve ser ajustada trimestralmente para cada paciente considerando aspectos clínicos, exames laboratoriais e radiológicos. A ausência de sinais de Cushing e de virilização são critérios que indicam bom controle, bem como velocidade de crescimento entre os percentis 25-90, desenvolvimento normal da puberdade, controle pressórico e do avanço da idade óssea. A eficácia do tratamento também é avaliada através das dosagens de androstenediona, testosterona, renina, sódio e potássio, coletados às 8:00 hs, antes da ingestão do medicamento.

1.1.2 Complicações da Terapia da Deficiência da 21-Hidroxilase

Embora a terapia da 21-OHD seja efetiva em evitar a crise de perda de sal, ao mesmo tempo apresenta limitações, uma vez que não é possível mimetizar o ritmo circadiano de secreção do cortisol; ocorrendo um pico de absorção da hidrocortisona em 1-2 horas após sua ingestão e concentrações mínimas após 6 horas, fato que pode contribuir para elevação do ACTH e, consequentemente, dos andrógenos. Observa-se em alguns pacientes, apesar da boa aderência ao tratamento, um comprometimento no *feedback* negativo do cortisol ao ACTH, resultando em hiperatividade adrenal. Por outro lado, as flutuações nas concentrações séricas de glicocorticoide podem resultar em efeitos adversos, tais como: obesidade, hipertensão e/ou resistência à insulina. Entretanto, são escassos dados na literatura relatando a frequência destas complicações no tratamento da 21-OHD e de seus fatores etiológicos.

1.1.3 Obesidade

Prevalência maior de obesidade foi observada em dois trabalhos que analisaram casuísticas de adolescentes com a forma clássica da 21-OHD, predominando naqueles que receberam doses maiores de glicocorticoide durante os dois primeiros anos de vida. Aproximadamente 75% destes pacientes desenvolveram obesidade depois dos seis anos de tratamento (15, 16). Os dados expostos sugerem que a tendência de supertratamento nos primeiros anos de vida a fim de se evitar a crise de perda de sal, pode se correlacionar com o maior índice de massa corporal (IMC) entre 1-2 anos

de idade, sendo este um forte preditor de obesidade na idade adulta (17). Adicionalmente, maior IMC também foi encontrado em adultos com a forma clássica, assim como maior conteúdo de gordura corporal e/ou truncal do que na população geral (17, 18).

Entretanto, a frequência maior de obesidade na 21-OHD não é um achado universal, outros estudos identificaram frequências similares às da população geral (19, 20), não estando claro até o momento quais fatores poderiam estar envolvidos no desenvolvimento da obesidade: 1) tipo de glicocorticoide utilizado, 2) dose diária de glicocorticoide necessária para se obter bom controle hormonal, cujos critérios são variáveis de acordo com o serviço e/ou 3) suscetibilidade genética na ação e/ou metabolismo do glicocorticoide.

1.1.4 Perfil Lipídico

O perfil lipídico em crianças e adultos com 21-OHD sob terapia com glicocorticoides têm sido similar aos da população geral (21-24). Foi observado que a razão HDL/LDL é mais favorável em um subgrupo de 34 mulheres com 21-OHD e com mais de 30 anos em comparação aos controles (21); dados semelhantes foram identificados em pacientes adultos com 21-OHD em comparação ao grupo controle pareado pelo IMC (25). Adicionalmente, nenhuma diferença nas concentrações de LDL-c foram encontradas entre pacientes com peso normal e com sobre peso (26); porém, no estudo multicêntrico de Arlt *et al.* (27) foi relatado alta prevalência de dislipidemia. Vale a pena ressaltar, que nesta última série, significante

porcentagem dos pacientes apresentavam valores suprimidos dos esteroides adrenais.

Embora a maioria dos trabalhos não tenha identificado um perfil lipídico adverso em pacientes em terapia de reposição com glicocorticoide, alguns estudos isolados têm observado valores elevados de triglicérides e baixos de HDL-c em crianças e adultos (28, 29).

Com relação aos pacientes com diagnóstico tardio, que tiveram exposição em longo prazo ao hiperandrogenismo, identificou-se elevação das concentrações de triglicérides e diminuição do HDL-c em mulheres portadoras da forma virilizante simples (30).

1.1.5 Resistência à Insulina

A prevalência de diabetes tipo 2 não está aumentada em pacientes com a forma clássica da 21-OHD; entretanto, frequência aumentada de diabetes gestacional tem sido reportada (21, 31). Resistência à insulina, outro fator de risco para o diabetes tipo 2, tem sido avaliada através de vários métodos, sendo na maioria dos trabalhos pelo HOMA (23-27, 29, 30, 32-35) ou com o teste de tolerância à glicose (22-24, 26, 29, 30); tendo sido demonstrado aumento da frequência da resistência à insulina (22-24, 29, 32, 34, 36, 37). Este achado foi significativamente mais frequente em mulheres europeias com idade superior a 30 anos, mesmo na comparação de pacientes não obesas com seus controles não obesos (21, 22, 33).

Crianças com 21-OHD também apresentam concentrações mais elevadas de insulina basal e valores maiores do HOMA em relação aos

indivíduos normais pareados para o peso. Estes resultados apresentaram correlação positiva com o IMC em trabalho que avaliou 18 crianças com a forma clássica da 21-OHD (34).

1.1.6 Hipertensão

Dados sobre a pressão arterial apresentam resultados divergentes em pacientes com 21-OHD (21-25, 27, 30, 38-42). Em casuística holandesa de crianças com a forma clássica, a pressão arterial apresentou-se normal durante o primeiro ano de vida, embora apenas 7/24 delas eram portadoras da forma perdedora de sal (42), assim como em outros dois estudos de pacientes alemães e australianos (39, 40). Entretanto, hipertensão foi identificada em 6,6% de crianças de casuística americana (43), e através do uso de *holter* de 24-h em outras duas casuísticas, em 11% e 58% (38, 41), respectivamente. Assim como observado na população geral, em pacientes com 21-OHD, os valores da pressão arterial se correlacionam com o grau de obesidade (38, 41); entretanto, um único estudo não achou esta correlação (43).

No grupo de adultos com 21-OHD, os valores da pressão arterial apresentaram-se normais e similares aos controles, (21, 22, 24), inclusive em análises com *holter* de 24 horas em três grandes estudos. Por outro lado, aumento da pressão arterial diastólica, quando comparado à população de referência, foi observado em 138 mulheres em estudo multicêntrico do Reino Unido (27), porém, destaca-se que 45% das pacientes apresentaram valores suprimidos da 17-OHP.

Nos dois primeiros estudos, todos os pacientes e controles com idade inferior a 30 anos foram normotensos, embora entre pacientes e controles com idade superior a 30 anos o percentual com pressão sanguínea elevada ou em uso de anti-hipertensivos foi similar (21, 22). Valores elevados de pressão sanguínea (sistólica e diastólica) foram observados em uma coorte de 30 mulheres não tratadas com a forma virilizante simples (30). Recentemente, Mooij *et al.* (25) observaram que a pressão sanguínea de 24 horas estava elevada em 27 pacientes com a forma clássica da 21-OHD quando comparada às de controles pareados pelo IMC.

A introdução da terapia de reposição com glico/mineralocorticoide permitiu considerável melhora do prognóstico dos pacientes com 21-OHD. Entretanto, com o aumento da sobrevida tem se observado aumento da prevalência de comorbidades, como obesidade, hipertensão e síndrome metabólica, as quais podem ser decorrentes da exposição crônica aos corticoides (17). Os dados disponíveis na literatura são escassos, envolvem casuísticas pequenas e heterogêneas quanto à forma clínica e modalidade de tratamento e não tem avaliado a influência de fatores genéticos e/ou epigenéticos, os quais possuem impacto na população normal.

1.2 O Cortisol na Etiologia da Síndrome Metabólica

Síndrome metabólica (SM) é um conceito relativamente antigo, mas que tem despertado interesse nos últimos anos pelo aumento na sua frequência secundária à epidemia global da obesidade (44). A doença é

caracterizada por um conjunto de fatores de risco que predispõem ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes.

Por definição, síndrome metabólica constitui um grupo de características definida por obesidade abdominal, aumento das concentrações séricas de triglicérides, diminuição do HDL-c, hipertensão e aumento da glicose em jejum; a resistência à insulina é outro fator chave da SM. A etiologia desta doença é complexa; entretanto, vários fatores ambientais como dieta hipercalórica, sedentarismo e o tabagismo influenciam no seu desenvolvimento, assim como fatores genéticos.

É amplamente conhecido que o uso crônico de glicocorticoides e/ou o aumento de sua sensibilidade em tecidos alvo, podem predispor à dislipidemia, redução da sensibilidade periférica à insulina, concentrações elevadas de glicose plasmática, hipertensão e, consequentemente, à SM (45-47).

Diversos modelos teóricos foram desenvolvidos na tentativa de se identificar os seus fatores etiológicos (48), os quais envolvem fatores epigenéticos e genéticos. O tecido adiposo além de ser um órgão alvo da ação dos glicocorticoides, também desempenha papel central na síndrome metabólica. Alguns polimorfismos em genes relacionados à ação ou biodisponibilidade dos glicocorticoides são fortemente correlacionados à etiopatologia da síndrome metabólica.

1.3 Genes Relacionados à Variabilidade Individual na Biodisponibilidade e/ou Ação Periférica do Glicocorticoide

Indivíduos com SM possuem concentrações séricas de cortisol maiores do que a população normal (49-51), sendo esta diferença mais evidente dentre os portadores de SM com hipertensão arterial e/ou tolerância diminuída à glicose. Embora vários pacientes apresentem concentrações normais de cortisol, existem evidências de aumento da atividade periférica do cortisol e de alteração na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (49).

Tem sido observado que variantes genéticas do receptor de glicocorticoide, as quais aumentam a sua atividade, afetam a atividade do eixo HHA bem como o metabolismo lipídico. Adicionalmente, existem outros determinantes da ação do glicocorticoide além de seu receptor, como a atividade da enzima 11 β -hidroxiesteroida desidrogenase tipo 1 (11 β HSD1), a qual apresenta importante função na relação cortisol/adiposidade. Expressão aumentada desta enzima correlaciona-se fortemente com aumento do tecido adiposo, esteatose hepática e dislipidemia, bem como com aumento da expressão da isoforma alfa do receptor de glicocorticoide (51).

1.3.1 Enzima 11 β -Hidroxiesteroida Desidrogenase Tipo I

A enzima 11 β -hidroxiesteroida desidrogenase tipo 1, expressa nos tecidos hepático e adiposo, é dependente da doação de elétrons a partir da NADPH e possui ação redutase, convertendo a cortisona em cortisol (52).

O gene *HDS11B1* possui 6 exons (Figura 2), está localizado na região 1q32-41 e codifica uma proteína com 292 aminoácidos. Poucas variantes alélicas foram descritas neste gene; contudo, o polimorfismo ins4436A,

localizado no íntron 3, foi associado à diminuição da atividade de 11 β HSD1 (53), e consequentemente, com a diminuição na conversão de cortisona para cortisol.

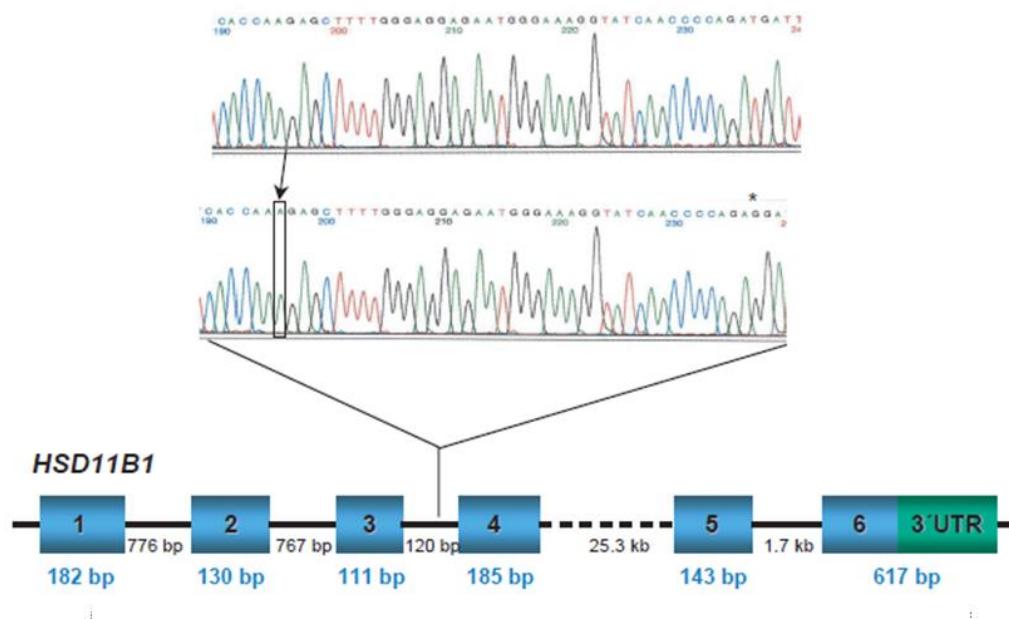


Figura 2 – Estrutura do gene que codifica a enzima 11BHSD1 e localização do polimorfismo ins4436A. Adaptado de Draper et al, 2003 (54).

Uma vez biotransformado, o cortisol pode permanecer ligado a globulinas plasmáticas ou continuar livre para exercer seus efeitos fisiológicos através do receptor de glicocorticoide (55). A sensibilidade ao glicocorticoide depende da densidade celular de seus receptores, bem como da eficiência da transdução do sinal mediada pelo complexo hormônio-receptor.

1.3.2 Receptor de Glicocorticoide

Os efeitos dos glicocorticoides são mediados por um receptor pertencente à superfamília de receptores nucleares; o receptor de

glicocorticoide (55). Este receptor age como um fator de transcrição, ativado pelo hormônio, atuando como um fator permissivo na transcrição de genes alvos.

O cortisol regula a distribuição, função e diferenciação do tecido adiposo, e, em excesso, causa obesidade visceral (56). Em adição, o cortisol desempenha um importante papel na homeostase da glicose e na regulação da pressão.

Do ponto de vista clínico é observado que alguns pacientes com 21-OHD parecem ser mais susceptíveis aos efeitos dos glicocorticoides do que outros. Supõe-se que os níveis de expressão do receptor de glicocorticoide, bem como sua afinidade de ligação ao hormônio são os maiores determinantes da sensibilidade ao cortisol (57).

A sensibilidade variável ao glicocorticoide é relacionada a polimorfismos no seu gene codificador (*NR3C1*), localizado na região 5q31-q32. Essas substituições podem causar tanto considerável diminuição da concentração do receptor, alterar a afinidade de ligação ao cortisol, como alterar a sua interação com o DNA (57, 58).

Foram descritos polimorfismos no gene *NR3C1*, destacando-se dentre eles dois polimorfismos no exon 2 (N363S, ER22/EK23), outro no intron 2 (*BclI*) e, finalmente, uma variante localizada na região 3' terminal do exon 9 (A3669G), a qual codifica a isoforma β (Figura 3). Algumas destas variantes são fortemente associadas com doenças endógenas, tais como; síndrome metabólica, obesidade e susceptibilidade ao sobrepeso em diabéticos e não-diabéticos (56, 59, 60).

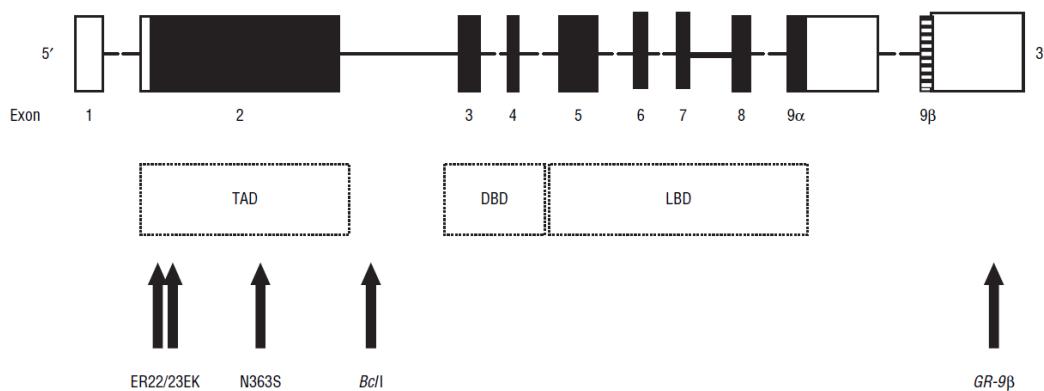


Figura 3 – Estrutura do gene *NR3C1* que codifica o receptor de glicocorticoide e localização dos polimorfismos ER22/23EK, N363S, *BclI* e A3669G (representado por GR-9 β). TAD, domínio de transativação; DBD, domínio de ligação ao DNA; LBD, domínio de ligação ao DNA; LBD, domínio de ligação do ligante. Adaptado de van den Akker, 2008 (61).

A variante *BclI*, que aumenta a sensibilidade ao cortisol, tem sido associada a um aumento da resistência à insulina e à síndrome metabólica (60, 62). A variante N363S, que também aumenta a sensibilidade ao cortisol, é associada a um significativo aumento do IMC, bem como obesidade abdominal (63, 64). O polimorfismo ER22/EK23 compreende duas mutações de ponto vinculadas, separadas por um par de bases nos códons 22 e 23 do exon 2 do *NR3C1*. Pacientes portadores desta variante são relativamente mais resistentes aos efeitos dos glicocorticoides quanto comparados aos indivíduos portadores do alelo selvagem. A presença desta variante foi também associada a concentrações mais baixas de colesterol e ao aumento da sensibilidade à insulina (65).

Os efeitos dos glicocorticoides são mediados pela isoforma funcional do GR, conhecida por isoforma alfa (GR α). A isoforma beta (9 β) decorre de uma alteração na região 3' terminal do exon 9 (A3669G), resultando em aumento de estabilidade do RNAm da isoforma GR β e aumento de sua

expressão. Consequentemente ocorre inibição da atividade de transcrição da isoforma GR α , resultando em resistência relativa ao glicocorticoide (66, 67). Este polimorfismo foi correlacionado com redução da adiposidade central em mulheres (59).

Os dados supracitados enfatizam a importância da coparticipação de fatores genéticos, tais como nos genes do receptor de glicocorticoide e 11 β -hidroxiesteroida desidrogenase tipo 1, na etiologia da síndrome metabólica na população geral e os quais supomos que também possam ter o seu papel em pacientes com 21-OHD.

2. JUSTIFICATIVA

Recentes dados da literatura demonstram que pacientes com a deficiência da enzima 21-hidroxilase apresentam maior prevalência de obesidade e/ou dos componentes da síndrome metabólica. A literatura sugere que diferenças interindividuais na sensibilidade e/ou sua ação periférica do glicocorticoide poderiam ser responsáveis por um pior perfil metabólico.

Entretanto, sabe-se que as diferenças interindividuais na resposta ao tratamento com glicocorticoides podem ser mediadas por variantes alélicas em genes relacionados à sensibilidade periférica ao glicocorticoide. Recentes evidências demonstram que os polimorfismos nos genes *NR3C1* e *HSD11B1* influenciam o fenótipo da obesidade e da síndrome metabólica na população geral. Os dados expostos nos sugerem que variantes nos genes supracitados poderiam modular o fenótipo de obesidade e síndrome metabólica de pacientes com a forma clássica da 21-OHD.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo:

- a) Avaliar a frequência de obesidade e de síndrome metabólica em pacientes com a forma clássica da deficiência da 21-hidroxilase;
- b) Caracterizar a distribuição alélica dos polimorfismos dos genes do receptor de glicocorticoide e da enzima 11 β -hidroxiesteroida desidrogenase tipo I em pacientes com a deficiência da 21-hidroxilase;
- c) Correlacionar a distribuição alélica dos polimorfismos dos genes supracitados com a presença dos componentes da síndrome metabólica.

4. MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq, da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (processo número 0231/2010). Após consentimento informado por escrito, obtivemos amostra de sangue periférico dos pacientes para extração de DNA genômico.

4.1 Pacientes

Os pacientes selecionados para este estudo fazem parte da casuística de 213 pacientes portadores da forma clássica deficiência da 21-hidroxilase, os quais são acompanhados na Unidade de Adrenal da Disciplina de Endocrinologia - HC-FMUSP. As avaliações hormonais e todos os estudos moleculares foram realizados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas, FMUSP.

4.2 Critérios de Inclusão

Os critérios de inclusão adotados para o presente trabalho foram:

- a) Pacientes com a forma clássica da 21-OHD;
- b) Bom controle hormonal, caracterizado por concentração normal de andrógenos e atividade plasmática de renina (APR) (68) de acordo com o sexo, no mínimo em 3 de 4 avaliações anuais, nos últimos 2 anos;

- c) Não utilização de medicamentos com características de indutores enzimáticos.

Dentre os pacientes da casuística, 109 pacientes atenderam aos critérios de inclusão, sendo 60 com a forma perdedora de sal e 49 com a forma virilizante simples. Na forma virilizante simples, todas as meninas apresentaram ambiguidade genital ao nascimento e ambos os sexos apresentaram marcada virilização na infância com avanço da idade óssea, na ausência de tratamento. Os pacientes com a forma perdedora de sal, além do quadro de virilização, apresentaram crise de perda de sal, caracterizada por desidratação acompanhada de hiponatremia e hipercalemia, ou hiponatremia associada à elevada APR, nas primeiras semanas de vida.

4.3 Critério Diagnóstico para Síndrome Metabólica

Para o diagnóstico de síndrome metabólica em crianças e adolescentes foram utilizadas as recomendações do NCEP-ATPIII, adaptado para o grupo pediátrico (69). Dessa forma, a síndrome metabólica foi diagnosticada na presença de três ou mais dos seguintes fatores:

- Circunferência abdominal (CA) \geq percentil 90;
- Glicose em jejum \geq 100mg/dL;
- Triglicérides \geq 110mg/dL;
- HDL-c $<$ 40mg/dL;

- PAS ou PAD \geq percentil 90.

Para o diagnóstico de síndrome metabólica em adultos também foram seguidos os critérios estabelecidos pela NCEP-ATPIII, ou seja, a presença de 3 ou mais dos fatores abaixo listados:

- Obesidade abdominal (CA $>$ 102 cm homem e $>$ 88 cm na mulher);
- Triglicérides $>$ 150 mg/dL;
- HDL $<$ 40 mg/dL no sexo masculino e $<$ 50 mg/dL no feminino;
- PA $>$ 130/85 mmHg;
- Glicose plasmática de jejum $>$ 110 mg/dL.

4.4 Dosagens Hormonais

As dosagens hormonais de 17OHP foram realizadas pelo método de radioimunoensaio. As dosagens de Δ 4-androstenediona e testosterona foram realizadas pelo método imunofluorimétrico. As dosagens de APR e cortisol foram realizadas pelo método radioimunoensaio. Os coeficientes de variação intra e interensaio foram menores do que 18% para todos os ensaios. As dosagens de sódio e potássio no soro foram realizadas em fotômetro de chama.

4.5 História Familiar dos Componentes da Síndrome Metabólica

O impacto da história familiar sobre a prevalência de obesidade e demais comorbidades metabólicas foi analisado. A história familiar foi

avaliada durante a consulta médica, por meio de entrevista com o paciente e/ou cuidador. História familiar foi definida "positiva" quando o paciente relatou ter parente de primeiro grau (pais, irmãos ou avós) que já haviam sido diagnosticados com hipertensão arterial, diabetes, dislipidemia, obesidade e/ou doença cardiovascular.

4.6 Dose de Glicocorticoide

A média da dose de glicocorticoide utilizada nos últimos dois anos foi convertida para equivalentes de hidrocortisona usando a seguinte relação: 30 mg hidrocortisona = 37,5 acetato de cortisona = 0,75 dexametasona e apresentadas em mg/m² (70).

4.7 Amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase

O DNA genômico foi extraído a partir de leucócitos de sangue periférico pelo método de extração com sal. O termociclador utilizado foi o *Veriti 96-Well termo Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose com tampão tris-acetato-EDTA (TAE) 1% em cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, USA), utilizando fonte *Model 250* (Gibco, Life Technology Inc. Gaithersburg, MD, USA).

Cinco microlitros dos produtos da PCR e 0,5 µg de marcador de peso molecular Φ X174/Hae III (Invitrogen, Life Technology, Gaithersburg, MD, USA), usado como referência, foram carregados no gel de agarose. As

bandas foram coradas com brometo de etídeo (0,5 mg/mL) (Invitrogen, Life Technology, Gaithersburg, MD, USA), visualizadas em luz ultravioleta (UV) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem *Ultra Cam Digital Imaging A650* (Ultra Lum, Inc., Claremont, CA, USA).

4.7.1 Gene Codificador da Enzima 21-Hidroxilase (*CYP21A2*)

Amostras de DNA dos pacientes foram submetidas previamente à estudo molecular do gene *CYP21A2* através de técnicas de *Southern blotting* e PCR alelo-específico. O sequenciamento foi realizado com as amostras dos casos em que o genótipo não foi resolvido com a utilização das duas metodologias iniciais (71).

4.7.2 Gene Codificador do Receptor de Glicocorticoide (*NR3C1*)

Diferentes metodologias foram utilizadas para detecção dos polimorfismos do gene codificador do receptor de glicocorticoide, conforme abaixo detalhado.

4.7.2.1 Polimorfismo *BclI*

Foi utilizada a metodologia de PCR alelo-específico para a pesquisa do polimorfismo *BclI*. Oligonucleotídeos externos específicos, sense e antisense (Figura 4), que flanqueiam a região de interesse, foram utilizados conforme protocolo previamente publicado por Gergics *et al.* 2006 (72). Também foram utilizados oligonucleotídeos internos específicos, sense

(mutante) e antisense (selvagem) (Figura 4), onde uma reação contém o oligonucleotídeo complementar ao alelo selvagem e a outra para o alelo mutante.

As reações consistiram de um mix contendo 1 μ L DNA, 2 UI de enzima Taq DNA polimerase, 5 μ L Buffer 10x, 25 pmol de cada oligonucleotídeos, 1,5 mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTPs em um volume final de 50 μ L. As condições da PCR foram inicialmente 95°C por 5 min., 35 ciclos de 95°C por 1 min., 56°C por 1 min. e 72°C por 1,5 min. Após esta etapa, houve uma extensão final de 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 2%.

Gene	Polimorfismo	Oligonucleotídeo	Sequência
NR3C1	<i>Bcll</i>	Sense	5'-AGAGCCCTATTCTTCAAATG-3'
		Antisense	5'-GAGAAATTCACCCCTACCAAC-3'
		Sense (mutante)	5'-GACAAGTTATGTTCTGCTGATG-3'
		Antisense (selvagem)	5'-CAATTCTCTCTAAAGAGATTG-3'
	N363S	Sense	5'-AGTACCTCTGGAGGACAGAT-3'
		Antisense	5'-GTCCATTCTTAAGAACAGG-3'
	A3669G	Sense	5'-GTCTTTTACCTACGCAGTG-3'
		Antisense	5'-ATGTTCTCCATATTGGCA-3'
HSD11B1	ER22/EK23	Sense	5'-CCAGTAATGTAACACTGCC-3'
		Antisense	5'-TTCGACCAGGGAAGTCAGA-3'
	4436insA	Sense	5'-TGAGCAATCTCTCATTTAAGCCC-3'
		Antisense	5'-TGTCCCTGTCCCACTTACCAGCC-3'

Figura 4 – Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na detecção dos polimorfismos dos genes NR3C1 e HSD11B1.

Os oligonucleotídeos externos produziram uma banda com 418 pb, que foi utilizada como controle de amplificação de cada reação. Na presença do alelo polimórfico houve a amplificação de uma banda com 284 pb e do alelo selvagem banda com 177 pb (Figura 5).

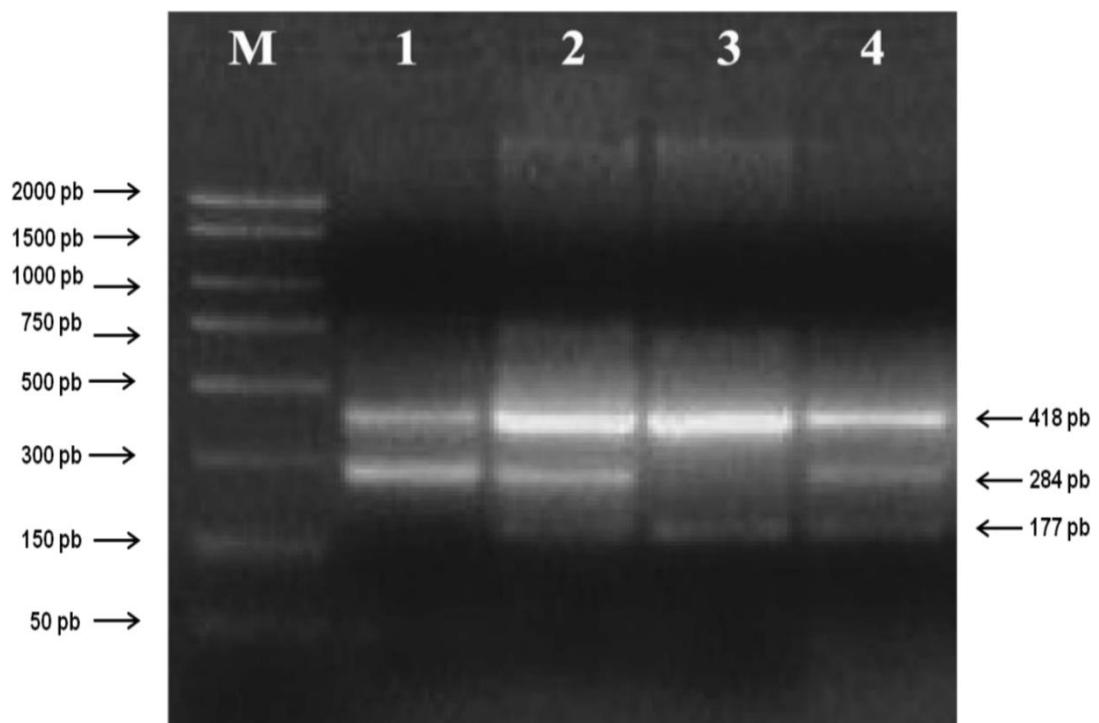


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose de produto de PCR alelo-específico para pesquisa do polimorfismo *Bcl* – *NCR3C1*. O controle de amplificação de cada reação está representado pela banda de 418 pb. A coluna 1 ilustra o padrão de amplificação de amostra homozigota para o alelo polimórfico e a coluna 3 o padrão de amostra homozigota selvagem (uma única banda específica de 177 pb) Nas colunas 2 e 4, nota-se o padrão de amplificação de amostras heterozigotas pela presença das bandas de 284 e 177 pb. M = marcador de peso molecular do DNA.

4.7.2.2 Variante N363S

O exon 2 do gene do receptor de glicocorticoide, região que contém este polimorfismo, foi amplificado com oligonucleotídeos específicos; sense e antisense (Figura 4).

As reações de PCR consistiram de 1 μ L de DNA, 2 UI de enzima Taq DNA polimerase, 5 μ L de Buffer 10x, 25 pmol de cada um dos oligonucleotídeos, 1,5 mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTPs em um volume final de 50 μ L. A termociclagem ocorreu com uma temperatura inicial de 96°C por 5 min., 35 ciclos de 95°C por 30 seg., 54°C por 30 seg. e 72°C por 30 seg. Após os ciclos houve uma extensão final 72°C por 7 min., adaptado de trabalho previamente publicado (73).

4.7.2.3 Variantes A3669G e ER22/EK23

Para análise destes polimorfismos foram utilizados oligonucleotídeos específicos, sense e antisense (Figura 4), que flanqueiam a região de interesse para amplificação seguida de sequenciamento. As reações consistiram de 1 μ L de DNA, 1 unidade de enzima Taq DNA polimerase, 5 μ L de Buffer 10x, 25 pmol de cada um dos oligonucleotídeos, 1,5 mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTPs em um volume final de 50 μ L. Foi utilizado o PCR *touchdown*, que consistiu de 10 min. de desnaturação a 94°C, após 15 ciclos de 94°C por 20 seg., 1 min. à 72°C e temperatura de anelamento inicial que foi de 63°C, com diminuição de 1°C a cada 2 ciclos. Após esta etapa foram utilizados mais 40 ciclos com as mesmas condições e temperatura de anelamento a 56°C, finalizando com uma extensão final de 72° por 7 min. Estas condições de termociclagem estão de acordo com protocolo previamente publicado (65). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% e posteriormente submetidos ao sequenciamento, descrito no final desta sessão.

4.7.3 Gene Codificador da Enzima 11 β -Hidroxiesteroides Desidrogenase Tipo 1 (*HSD11B1*)

O protocolo de amplificação do íntron 3 do gene *HSD11B1* foi adaptado de Robitaille *et al.*, 2004 (74). Em cada reação de PCR foi utilizado 100-200 ng de DNA genômico, 200 μ M de dNTP, 1,5 unidade da enzima GoTaq DNA Polimerase (Promega Corporation, EUA), 25 pmol de cada um dos oligonucleotídeos, 1x Green GoTaq buffer (5x) que já contém 7,5 mM de magnésio (Promega Corporation, EUA) e água para completar 50 μ L do volume final. As condições da PCR foram inicialmente 94°C por 5 min., 35 ciclos de 95°C por 1 min., 55°C por 1 min e 72°C por 1,5 min. Após esta etapa, houve uma extensão final de 72°C por 7 min. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% e posteriormente submetidos ao sequenciamento, que será descrito no final desta sessão.

4.8 Estudo por Sequenciamento de DNA

As variantes A3669G, N363S e ER22/23EK e 4436insA foram rastreadas por sequenciamento dos produtos de PCR. As amostras foram purificadas com 2 μ L da enzima ExoSAP (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) para cada 5 μ L de produto de PCR. Os produtos de PCR dos genes *NR3C1* e *HSD11B1* foram submetidos ao sequenciamento direto automático com oligonucleotídeos específicos acima citados, pelo método de terminação de cadeia com o kit ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Perkin-Elmer

Corporation, Inc., Foster City, EUA). As reações de sequenciamento foram submetidas à eletroforese capilar no sequenciador automático de DNA ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems the Perkin Elmer Corporation CN, Foster). As sequências foram analisadas pelo programa Sequencher versão 4.9 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) e comparadas com as respectivas sequências selvagens depositadas no Gene Bank: *NR3C1* (MIM:138040) e *HSD11B1* (MIM 600713).

4.9 Análise Estatística

As análises paramétricas foram calculadas por *t-test* e descritas como média \pm desvio padrão (DP). As análises que falharam no teste de normalidade ($P < 0,05$) foram calculadas pelo teste não paramétrico Mann-Whitney. A comparação das frequências dos genótipos entre os grupos de pacientes e sexo foi feita através do teste Chi-quadrado e as variáveis contínuas foram comparadas por meio do *t-test*.

Os pacientes foram divididos em grupos pediátricos ($\leq 17,9$ anos) e adultos (≥ 18 anos). Nas análises de associação entre os genótipos e o perfil metabólico os polimorfismos foram agrupados em modelos de herança dominante e codominante.

Os resultados da comparação das variáveis foram ajustados para a idade, sexo e forma clínica por meio de análise de regressão. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para calcular correlações entre o IMC, a dose de GC, insulina, HOMA, e concentrações de lipídios. Análise de correlação foi também aplicada para comparar concentrações médias de

andrógenos nos últimos dois anos de tratamento de GC com IMC, circunferência abdominal, pressão arterial e perfil metabólico. $P<0,05$ foi considerado estatisticamente significante.

As variantes em equilíbrio de Hardy-Weinberg e com frequência alélica maior do que 5% foram selecionadas para as análises de associação. A análise estatística foi feita utilizando o software SigmaStat versão 3.5 para Windows (Systat Software, Point Richmond, CA).

5. RESULTADOS

5.1 Marcadores Clínicos e Bioquímicos do Risco Metabólico em Crianças e Adolescentes com 21-OHD

Os dados clínicos e antropométricos das crianças e adolescentes com a deficiência da 21-hidroxilase estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Características clínicas e antropométricas das crianças e adolescentes com a deficiência da 21-hidroxilase.

Variáveis	Meninas (N= 22)	Meninos (N= 19)	Valor de P
Idade, média ± DP, anos	12,2 (3,8)	10,4 (3,9)	0,155
Z-score do IMC, média ± DP	1,10 (1,05)	0,86 (0,88)	0,413
Circunferência abdominal, média ± DP, cm	68,8 (9,5)	67,1 (10,5)	0,629
Glicose, média ± DP, mg/dL	82,7 (7,4)	84,3 (11,1)	0,567
Insulina, média ± DP, µIU/ml	15,0 (9,9)	10,9 (9,7)	0,094
HOMA-IR, média ± DP	1,87 (1,20)	1,35 (1,14)	0,094
Colesterol total, média ± DP, mg/dL	155,7 (36,9)	145,1 (24,3)	0,312
HDL-c, média ± DP, mg/dL	49,7 (15,8)	42,8 (11,9)	0,144
LDL-c, média ± DP, mg/dL	91,7 (32,6)	89,9 (21,7)	0,832
Triglicérides, média ± DP, mg/dL	71,5 (34,8)	63,1 (23,7)	0,723
Pressão sanguínea > p,90 th , nº, %	2 (9)	2 (11)	0,699

IMC, índice de massa corpórea; DP, desvio padrão; HDL-c, lipoproteína de alta densidade; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade

Obesidade foi observada em 31,7% dos jovens (n = 13), sendo 10 portadores da forma PS da 21-OHD e 9 do sexo feminino. Sobrepeso foi observado em 19,5% dos pacientes jovens (n = 8), sendo 4 com forma PS e 4 do sexo feminino. A média da dose de GC nos pacientes jovens obesos, com sobrepeso e com peso normal foi de $9,3 \pm 3,1$ mg/m²/dia, $10,1 \pm 3,8$ mg/m²/dia

e $10,8 \pm 4,4$ mg/m²/dia ($P > 0,05$. Figura 6), respectivamente, e a média da duração da terapia foi $9,6 \pm 5,4$ anos, $10,4 \pm 2,5$ anos e $9,6 \pm 5,1$ anos ($P > 0,05$), respectivamente. Não houve correlação significativa entre o zIMC, sexo, forma clínica da 21-OHD, duração da terapia e dose de GC ($P > 0,05$).

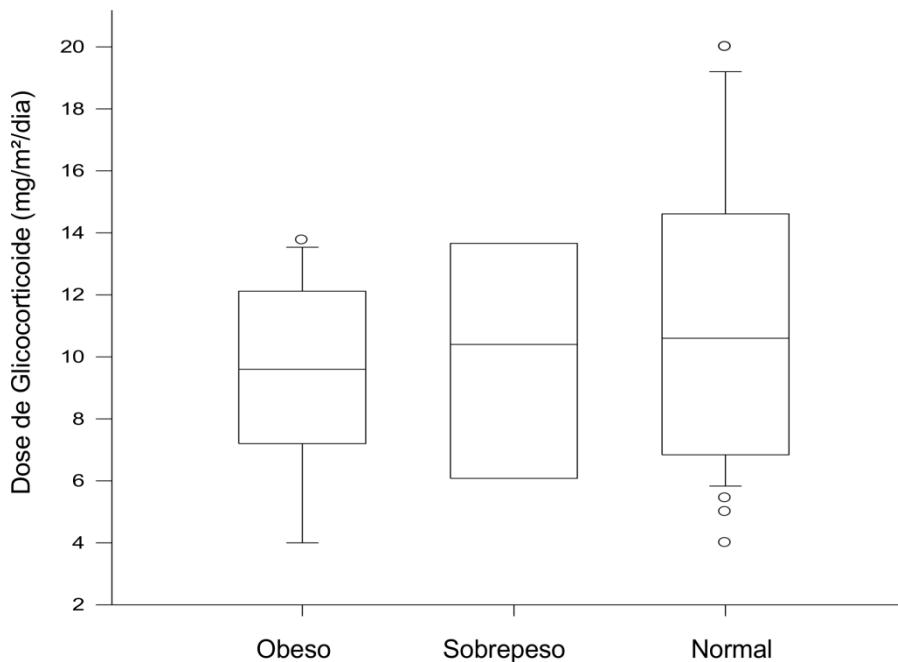


Figura 6 – Comparação da dose de GC entre pacientes jovens obesos, sobre peso e com peso normal. $P > 0,05$.

Síndrome metabólica foi observada em 6 (14,6%) pacientes, sendo 4 portadores da forma perdedora de sal e 3 do sexo feminino. zIMC foi positivamente correlacionado com a PAS, HOMA-IR, colesterol total, TG e LDL-c ($P < 0,01$), independentemente do sexo, forma clínica, duração do tratamento, dose e tipo de glicocorticoide.

A prevalência dos componentes da SM foi maior no grupo de crianças e adolescentes obesos quando comparado aos pacientes não obesos (Figura 6). Os obesos apresentaram maior frequência de hipercolesterolemia com

baixas concentrações de HDL-c e altas de triglicérides quando comparado aos pacientes não obesos.

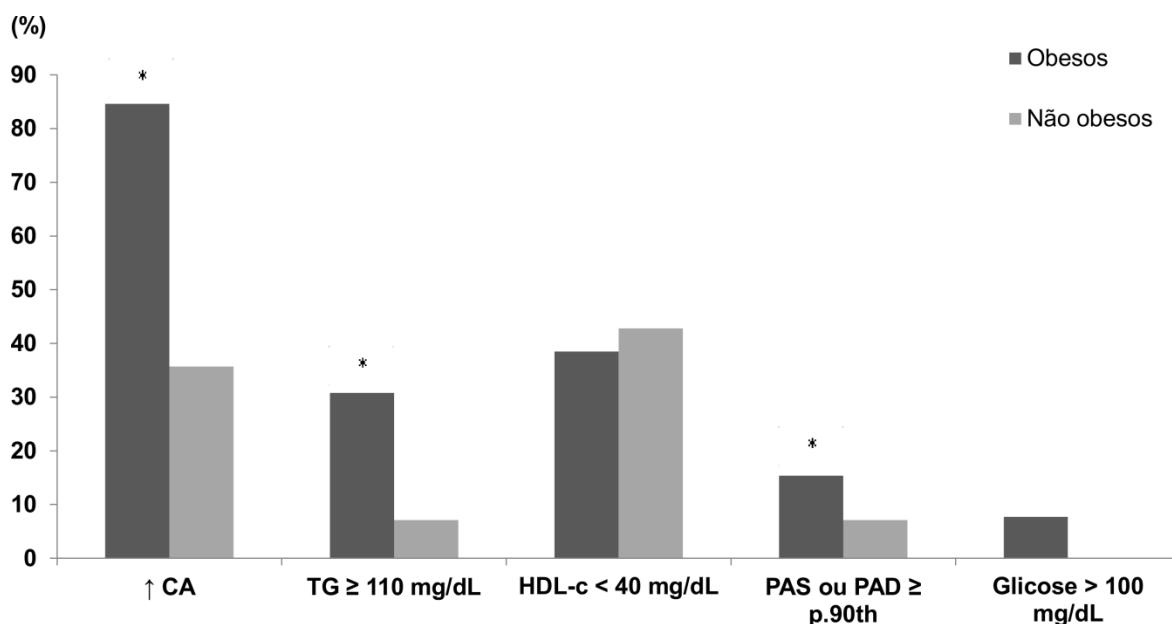


Figura 7 – Comparação entre a frequência dos componentes da síndrome metabólica entre os pacientes jovens obesos e não obesos com 21-OHD.

Interessantemente, pacientes jovens com a forma PS apresentaram um pior perfil lipídico quando comparados aos pacientes portadores da forma VS, caracterizado por aumento de colesterol total, LDL-c e TG, assim como baixas concentrações de HDL-c, independentemente do zIMC, da duração do tratamento, da dose e do tipo de glicocorticoide utilizado na terapia de reposição hormonal (Tabela 2). O valor do HOMA-IR não diferiu entre as formas clínicas VS e PS da 21-OHD. A dose média de GC também não diferiu entre as formas clínicas PS e VS ($9,5 \pm 2,9$ e $11,1 \pm 5,0$ mg/m²/dia, respectivamente, $P > 0.05$).

Tabela 2 – Comparação do perfil clínico e metabólico entre pacientes jovens portadores das formas perdedora de sal e virilizante simples da 21-OHD.

Variáveis	PS (n = 26)	VS (n = 15)	Valor de P
Idade, média ± DP, anos	10,6 (4,1)	12,8 (3,4)	0,090
Z-score do IMC, média ± DP	0,8 (1,2)	0,8 (0,8)	0,994
Circunferência abdominal, média ± DP, cm	66,4 (11,0)	70,8 (7,3)	0,177
Glicose, média ± DP mg/dL	82,4 (8,1)	85,1 (10,7)	0,368
Insulina, média ± DP, µIU/ml	12,7 (9,5)	13,9 (10,8)	0,548
HOMA-IR, média ± DP	2,6 (2,0)	2,9 (2,3)	0,371
Colesterol total, média ± DP, mg/dL	159,2 (33,7)	136,6 (23,7)	0,033
HDL-c, média ± DP, mg/dL	44,2 (12,8)	51,0 (16,7)	0,163
LDL-c, média ± DP, mg/dL	99,8 (30,7)	75,2 (12,3)	0,006
Triglicérides, média ± DP, mg/dL	76,4 (33,0)	52,4 (17,0)	0,014
Pressão Sanguínea > p,90th, nº (%)	2 (8)	2 (13)	0,762

IMC, índice de massa corpórea; DP, desvio padrão; HDL-c, lipoproteína de alta densidade; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade.

Dentre os jovens com 21-OHD, 13 deles já haviam atingido a estatura final e estavam recebendo dexametasona, onde a média do tempo desta terapia foi de $2,6 \pm 1,7$ anos. A análise de regressão linear múltipla não mostrou diferença no perfil clínico e metabólico entre pacientes recebendo acetato de cortisona e dexametasona, mesmo após o ajuste para o sexo, forma clínica e duração da terapia.

História familiar positiva para hipertensão foi relatada em 73,5% dos jovens, seguido por diabetes (63%), obesidade (55%), dislipidemia (40%) e doença cardiovascular (35%). História familiar positiva para obesidade, hipertensão, dislipidemia e doença cardiovascular foram mais frequentes nos jovens obesos quando comparado aos não obesos: obesidade 67% vs 50%,

dislipidemia 50% vs 36%, diabetes 62% vs 62%, hipertensão 80% vs 69%, e doença cardiovascular 60% vs 29%, respectivamente (Figura 8).

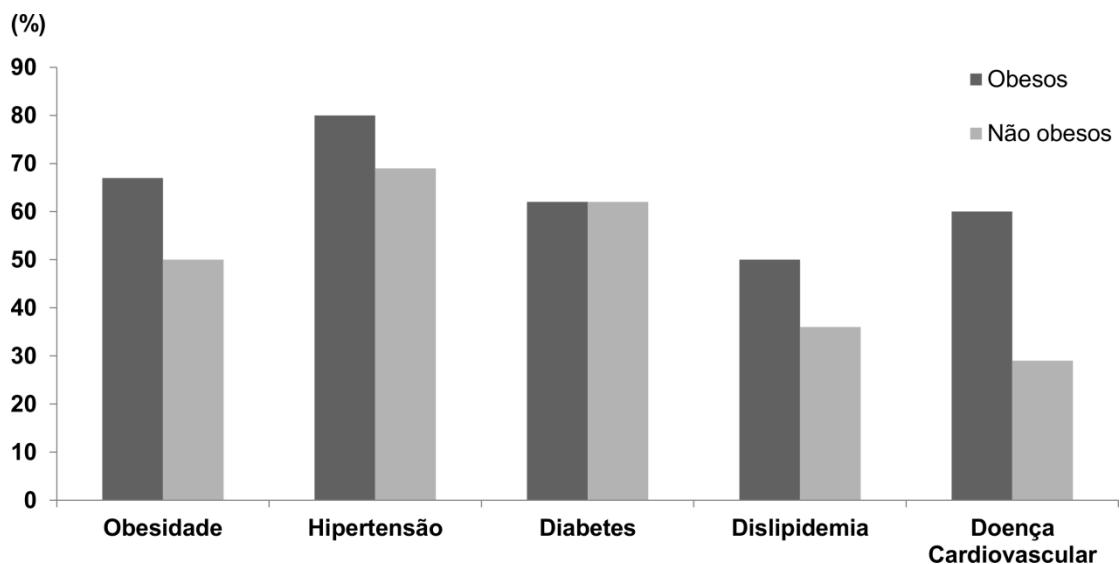


Figura 8 – Comparação da história familiar para obesidade, hipertensão, diabetes, dislipidemia e doença cardiovascular entre pacientes jovens obesos e não obesos com 21-OHD.

5.1.1 Impacto dos Polimorfismos nos Genes *NR3C1* e *HSD11B1* Sobre o Perfil Metabólico de Crianças e Adolescentes com 21-OHD

A frequência alélica dos polimorfismos do *NR3C1* (*Bcll* e A3669G) e *HSD11B1* (4436InsA) no grupo de crianças e adolescentes apresentou equilíbrio de Hardy-Weinberg. O polimorfismo *Bcll* foi encontrado em 23,2% dos alelos, com 1 paciente em homozigose e 19 em heterozigose. O polimorfismo A3669G foi encontrado em 9,7% dos alelos dos pacientes jovens, sendo encontrado em homozigose em 1 paciente e em heterozigose em 6 pacientes. A variante 4436InsA foi identificada em 14,6% dos alelos,

onde 12 pacientes apresentaram heterozigose e nenhum em homozigose. Os polimorfismos N363S e ER22/23EK foram identificados em apenas um paciente, cada um, em heterozigose.

As variantes estudadas no grupo de crianças e adolescentes com 21-OHD e suas respectivas frequências alélicas nas populações Caucásiana, Africana e Asiática estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Frequência alélica das variantes dos genes *NR3C1* e *HSD11B1* nas crianças e adolescentes com 21-OHD e nas populações Caucásiana, Africana e Asiática.

Gene	Polimorfismo	Localização	NCBI	Frequência alélica (%)			
				21-OHD*	Caucasianos ¹	Africanos ¹	Asiáticos ¹
<i>NR3C1</i>	<i>Bcll</i>	Intron 2	rs41423247	23,2	28,9 ¹	20,2 ¹	32,8 ¹
	A3669G	Exon 9β	rs6198	9,7	17	4	0
	N363S	Exon 2	rs6195	1,2	3,1	0,5	0
	ER22/23EK	Exon 2	rs6189/6190	1,2	3,0	0	0
<i>HSD11B1</i>	4436InsA	Intron 3	rs12086634	14,6	21	18	22

*Presente estudo

¹ HAPMAP (Ensembl)

Para análise estatística, selecionamos apenas polimorfismos com frequência alélica ≥ 5% (*Bcll*, A3669G e 4436InsA). Considerando que as variantes *Bcll*, A3669G e 4436InsA foram identificadas em homozigose em apenas um paciente, cada uma, os pacientes foram considerados como “carreadores”.

A Tabela 4 ilustra a comparação do perfil clínico e metabólico entre pacientes carreadores e não carreadores do polimorfismo *Bcll*. Conforme podemos observar na Tabela 4, não houve diferença estatisticamente significante no perfil clínico e metabólico entre os pacientes carreadores e não carreadores desta variante alélica.

Tabela 4 – Influência do polimorfismo *BclI* sobre o perfil metabólico de pacientes jovens com a deficiência da 21-hidroxilase.

Variáveis	Genótipo		Valor de <i>P</i> ajustado #
	<i>BclI</i> <i>n</i> = 20	Alelo Selvagem <i>n</i> = 21	
Z-score do IMC, média ± DP	1,01 (1,06)	0,80 (0,91)	0,549
Circunferência abdominal, média ± DP, cm	69,6 (11,5)	67,9 (6,5)	0,630
Relação cintura/quadril, média ± DP	0,82 (0,07)	0,81 (0,04)	0,484
Circunferência abdominal aumentada, nº (%)	9 (50)	12 (52,1)	0,860
Dose de GC, média ± DP, mg/m ²	10,3 (4,0)	9,4 (4,4)	0,561
Duração do tratamento, média ± DP, anos	10,9 (4,8)	9,4 (4,6)	0,464
HOMA-IR, média ± DP	1,43 (0,82)	1,91 (1,27)	0,219
Colesterol total, média ± DP, mg/dL	153,7 (42,4)	146,9 (22,8)	1,00
HDL-c, média ± DP, mg/dL	46,3 (12,0)	45,2 (15,8)	0,601
LDL-c, média ± DP, mg/dL	93,2 (37,3)	89,2 (16,7)	0,732
Triglicérides, média ± DP, mg/dL	70,9 (36,1)	63,5 (27,5)	0,652
Pressão sanguínea > p,90th, nº (%)	3 (16,7)	1 (4,3)	0,430
			0,324

* Análise univariada

Ajustado para sexo, idade e forma clínica

IMC, índice de massa corpórea; DP, desvio padrão; HDL-c, lipoproteína de alta densidade; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade; GC, glicocorticoide

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na frequência do polimorfismo *BclI* entre pacientes obesos e não obesos com 21-OHD (45% vs. 45%, respectivamente). A variante *BclI* foi mais frequente no grupo de pacientes com síndrome metabólica quando comparado aos pacientes sem SM (66% vs 37,2%, respectivamente. *P* = 0,824). Contudo, não houve diferença com significância estatística.

A Tabela 5 apresenta a comparação do perfil clínico e metabólico entre pacientes carreadores e não carreadores do polimorfismo A3669G. Interessantemente, os pacientes carreadores do polimorfismo A3669G apresentaram pior perfil lipídico, caracterizado por maiores concentrações de

LDL-c quando comparado aos pacientes não carreadores ($110,9 \pm 38,3$ mg/dL e $85,3 \pm 23,2$ mg/dL, respectivamente).

Tabela 5 – Influência do polimorfismo A3669G sobre o perfil metabólico de pacientes jovens com a deficiência da 21-hidroxilase.

Variáveis	Genótipo		Valor de <i>P</i> *	Valor de <i>P</i> ajustado [#]
	A3669G n = 7	Alelo Selvagem n = 34		
Z-score do IMC, média ± DP	1,63 (0,66)	0,77 (1,00)	0,037	0,226
Circunferência abdominal, média ± DP, cm	72,0 (0,66)	67,8 (10,6)	0,331	0,089
Relação cintura/quadril, média ± DP	0,84 (0,08)	0,81 (0,05)	0,176	0,279
Circunferência abdominal aumentada, nº (%)	6 (85,7)	15 (34,1)	0,112	0,208
Dose de GC, média ± DP, mg/m ²	7,7 (3,5)	10,5 (3,9)	0,085	0,125
Duração do tratamento, média ± DP, anos	11,1 (4,2)	9,7 (5,0)	0,542	0,657
HOMA-IR, média ± DP	2,4 (1,2)	3,0 (2,3)	0,968	0,686
Colesterol total, média ± DP, mg/dL	162,6 (45,2)	147,2 (29,8)	0,281	0,237
HDL-c, média ± DP, mg/dL	39,1 (7,5)	48,3 (15,2)	0,132	0,176
LDL-c, média ± DP, mg/dL	110,9 (38,3)	85,3 (23,2)	0,029	0,021
Triglicérides, média ± DP, mg/dL	62,9 (23,3)	69,7 (34,2)	0,726	0,633
Pressão sanguínea > p,90th, nº (%)	1 (14,3)	3 (8,8)	0,798	0,752

* Análise univariada

Ajustado para sexo, idade e forma clínica

IMC, índice de massa corpórea; DP, desvio padrão; HDL-c, lipoproteína de alta densidade; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade; GC, glicocorticoide

O polimorfismo A3669G foi mais frequente no grupo de pacientes obesos quando comparado ao grupo de jovens não obesos com 21-OHD (30% vs. 5%, respectivamente. $P = 0,313$). Contudo, não houve diferença estatisticamente significante. Também não foram identificadas diferenças estatisticamente significantes entre pacientes com e sem SM (16,6% vs. 11,4%, respectivamente. $P = 0,098$).

Com relação ao polimorfismo 4436InsA, não observamos diferenças estatisticamente significantes no perfil metabólico entre pacientes carreadores e não carreadores desta variante (Tabela 6).

Tabela 6 – Influência do polimorfismo 4436InsA sobre o perfil metabólico de pacientes jovens com a deficiência da 21-hidroxilase.

Variáveis	Genótipo		Valor de <i>P</i> *	Valor de <i>P</i> ajustado#
	HDS11B1 n = 12	Alelo Selvagem n = 29		
Z-score do IMC, média ± DP	0,69 (0,79)	1,09 (1,07)	0,255	0,245
Circunferência abdominal, média ± DP , cm	66,7 (10,9)	68,6 (9,6)	0,791	0,477
Relação cintura/quadril, média ± DP	0,81 (0,05)	0,82 (0,06)	0,479	0,496
Circunferência abdominal aumentada, nº (%)	5 (41,6)	14 (48,3)	0,967	0,748
Dose de GC, média ± DP, mg/m ²	11,2 (4,6)	9,8 (3,6)	0,341	0,307
Duração do tratamento, média ± DP, anos	9,7 (4,5)	9,8 (4,8)	0,947	0,154
HOMA-IR, média ± DP	1,18 (0,43)	1,93 (1,36)	0,085	0,064
Colesterol total, média ± DP, mg/dL	141,8 (25,8)	154,8 (34,0)	0,263	0,612
HDL-c, média ± DP, mg/dL	48,0 (16,4)	46,1 (14,0)	0,719	0,814
LDL-c, média ± DP, mg/dL	81,5 (17,4)	94,6 (30,8)	0,193	0,438
Triglicérides, média ± DP, mg/dL	61,7 (22,3)	70,2 (33,1)	0,585	0,852
Pressão sanguínea > p,90th, nº (%)	0	4 (13,8)	0,223	0,634

* Análise univariada

Ajustado para sexo, idade e forma clínica

IMC, índice de massa corpórea; DP, desvio padrão; HDL-c, lipoproteína de alta densidade; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade; GC, glicocorticoide

A variante 4436InsA foi menos frequente no grupo de jovens obesos quando comparado ao grupo de jovens não obesos com 21-OHD (18,2% vs. 53,8%, respectivamente. *P* = 0,403). Entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significante. O polimorfismo 4436InsA não foi observado em pacientes com síndrome metabólica.

5.2 Marcadores Clínicos e Bioquímicos do Risco Metabólico em Adultos com 21-OHD

Os dados clínicos e antropométricos dos adultos com a deficiência da 21-hidroxilase estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 – Características clínicas e antropométricas de 68 adultos com a deficiência da 21-hidroxilase.

Variáveis	Mulheres (N=48)	Homens (N=20)	Valor de P
Idade, média ± DP, anos	29,2 (9,5)	26,9 (6,8)	0,449
IMC, média ± DP, kg/m ²	25,7 (4,1)	29,5 (7,1)	0,035
Circunferência abdominal aumentada, n (%)	7 (14,6)	7 (35)	0,238
Relação cintura/quadril, média ± DP	0,83 (0,07)	0,91 (0,06)	0,001
Dose de GC, média ± DP, mg/m ²	11,2 (4,5)	10,5 (3,7)	0,696
Duração do tratamento, média ± DP, anos	26,6 (10,6)	21,9 (7,2)	0,039
Glicose, média ± DP, mg/dL	82,9 (7,7)	84,8 (8,7)	0,383
Insulina, média ± DP, UI	10,8 (4,5)	12,8 (7,0)	0,289
HOMA-IR, média ± DP	2,24 (1,02)	2,5 (1,7)	0,376
Colesterol total, média ± DP, mg/dL	174 (35)	186,3 (33,3)	0,186
HDL-c, média ± DP, mg/dL	58,2 (13,2)	49 (12)	0,010
LDL-c, média ± DP, mg/dL	100,2 (28)	116,8 (26,9)	0,033
Triglicérides, média ± DP, mg/dL	78,4 (40,5)	102,7 (45,8)	0,014
PAS, média ± DP, mmHg	118,7 (18,9)	123,5 (8,3)	0,042
PAD, média ± DP, mmHg	76,9 (6,7)	80,1 (6,8)	0,074

IMC, índice de massa corpórea; DP, desvio padrão; GC, glicocorticoide, HDL-c, lipoproteína de alta densidade; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica.

Obesidade foi observada em 16 pacientes adultos com 21-OHD (23,5% dos pacientes), sendo mais prevalente nos homens (n = 9, 56%), e com frequência similar entre pacientes com as formas PS e VS (50%). Sobrepeso foi observado em 23 pacientes (33,8% dos pacientes) e mais frequente em pacientes com a forma PS (n = 13, 56,5%) e em mulheres (n= 18, 78,3%).

Síndrome Metabólica foi observada em 7,3% dos adultos, onde 3 dos 5 eram portadores da forma VS e 3 eram homens.

O IMC foi positivamente correlacionado com elevada PAS e PAD, triglicérides, LDL-c e HOMA ($P = 0.01$), e inversamente correlacionado com concentrações de HDL-c ($P = 0.03$). Não houve correlação entre IMC, a dose de GC, duração da terapia, assim como com as concentrações de testosterona e androstenediona. Estes dois últimos foram inversamente correlacionados com o HDL-c nas pacientes (testosterona $r = 20.45$, $P = 0.01$, androstenediona $r = 20.629$, $P = 0.01$). Os demais componentes da síndrome metabólica não foram correlacionados com as concentrações de andrógenos em ambos os sexos.

Não houve diferença estatisticamente significante na dose de GC utilizada entre pacientes obesos, com sobrepeso e de peso normal (Figura 9).

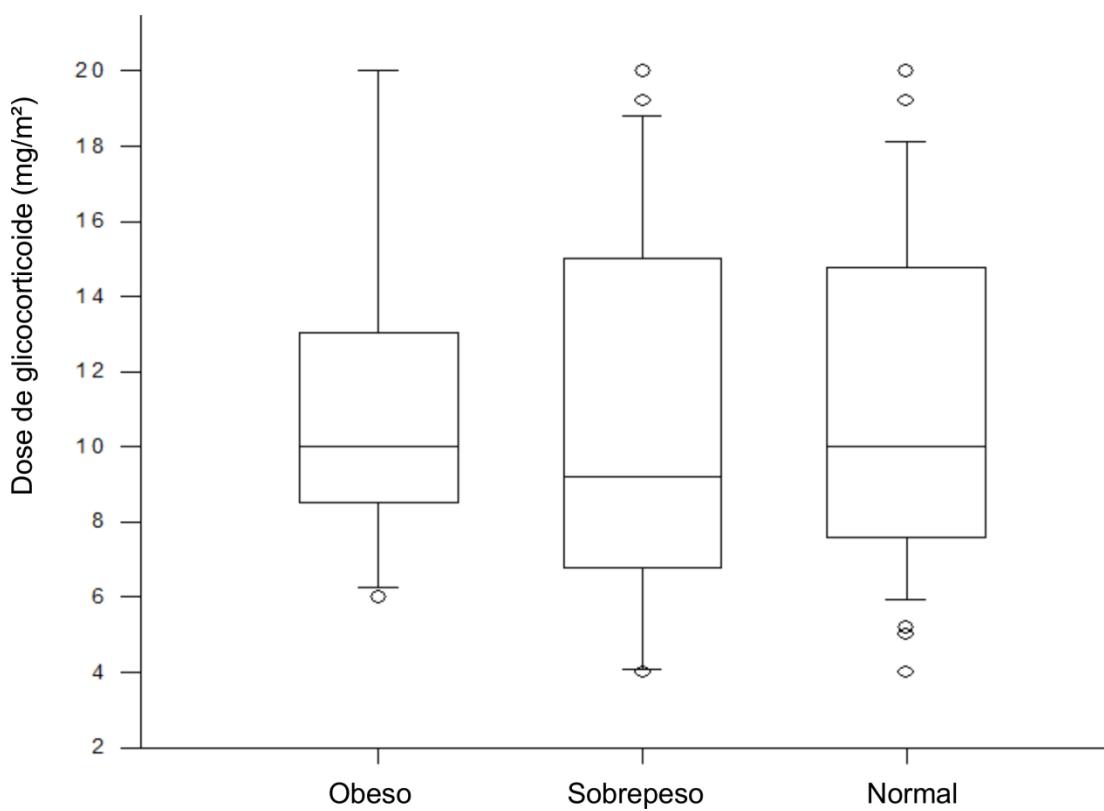


Figura 9 – Comparação da dose de GC entre pacientes adultos obesos, sobre peso e com peso normal. $P>0,05$.

Como esperado, os homens apresentaram um pior perfil metabólico quando comparados às mulheres, caracterizado por aumento da circunferência abdominal, IMC, pressão arterial, LDL-c, TG e menores concentrações de HDL-c (Tabela 7).

Aumento das concentrações de TG (≥ 150 mg/dL) foi observado em 10% dos pacientes adultos ($n = 7$), sendo que 4 dos 7 pacientes apresentaram a forma VS da 21-OHD. Baixas concentrações de HDL-c foram observadas em 19 pacientes (30% dos casos), com frequência elevada em pacientes com a forma PS quando comparado à forma VS ($n= 12$, 63%). Hipertensão foi identificada em 8 pacientes (12%), sendo mais prevalente em pacientes com a forma VS ($n= 5$, 71%).

Aumento da circunferência abdominal foi observado em 14 pacientes (20,6% dos casos), sendo mais prevalente em pacientes com a forma VS ($n=9$, 64%) e com frequência similar entre os sexos ($n=7$, 50%).

Baixa concentração de HDL-c foi o componente da síndrome metabólica mais frequente (30%), seguido por aumento da circunferência abdominal (23,5%), pressão arterial elevada (12%) e TG elevados (10%). Glicose plasmática em jejum maior que 110 mg/dL não foi observada no grupo de adultos com 21-OHD.

Os componentes da SM foram mais frequentes nos pacientes obesos em comparação aos não obesos (Figura 10, $P < 0.05$), independentemente do sexo, idade, dose do GC, forma clínica e duração do tratamento.

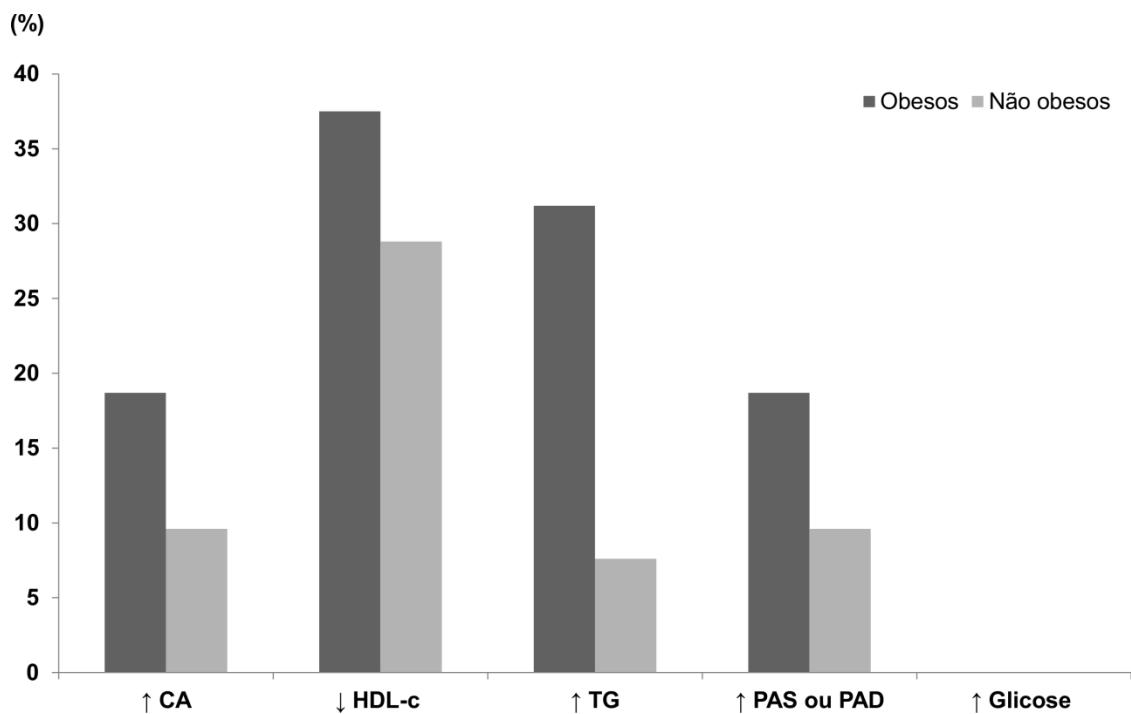


Figura 10 – Comparaçao da frequêcia dos componentes da síndrome metabólica entre os adultos obesos e não obesos com 21-OHD de acordo com os critérios do NCEP ATPIII

Diferentemente ao observado nos pacientes jovens, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes no perfil metabólico entre as formas clínicas da 21-OHD dos pacientes adultos (Tabela 8).

Tabela 8 – Comparação do perfil clínico e metabólico entre pacientes adultos portadores das formas Perdedora de Sal (PS) e Virilizante Simples (VS) da 21-OHD

Variáveis	PS (n=34)	VS (n=34)	Valor de P
Idade, média ± DP, anos	25,9 (4,8)	30,8 (10,8)	0,092
IMC, média ± DP	27,1 (5,3)	26,5 (5,5)	0,520
Circunferência abdominal, média ± DP, cm	84,2 (13,5)	82,0 (13,0)	0,548
Glicose, média ± DP, mg/dL	82,8 (9,4)	84,2 (6,3)	0,513
Insulina, média ± DP, µIU/ml	12,2 (5,5)	10,7 (5,2)	0,253
HOMA-IR, média ± DP	2,54 (1,34)	2,23 (1,19)	0,323
Colesterol total, média ± DP, mg/Dl	178,2 (41,3)	177,0 (27,3)	0,740
HDL-c, média ± DP, mg/dL	53,5 (12,9)	57,4 (13,9)	0,241
LDL-c, média ± DP, mg/dL	107,6 (33,0)	102,5 (23,4)	0,432
Triglicérides, média ± DP, mg/dL	87,0 (40,7)	84,1 (46,3)	0,645
PAS, média ± DP, mmHg	119,8 (9,3)	120,5 (8,7)	0,685
PAS, média ± DP, mmHg	77,8 (6,6)	77,9 (7,0)	0,968

IMC, índice de massa corporal; DP, desvio padrão; HDL-c, lipoproteína de alta densidade; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade

História familiar positiva para hipertensão foi relatada em 67,7% dos adultos com 21-OHD, seguida por obesidade (54,4%), dislipidemia (53,6%), diabetes (51,7%) e doença cardiovascular (46,5%). História familiar positiva dos componentes da síndrome metabólica foi mais frequente nos adultos obesos quando comparado aos não obesos com 21-OHD: hipertensão 69% vs. 67%, dislipidemia 61% vs. 51%, diabetes 67% vs. 47%, obesidade 67% vs. 50%, e doença cardiovascular 54% vs. 44%, respectivamente (Figura 11).

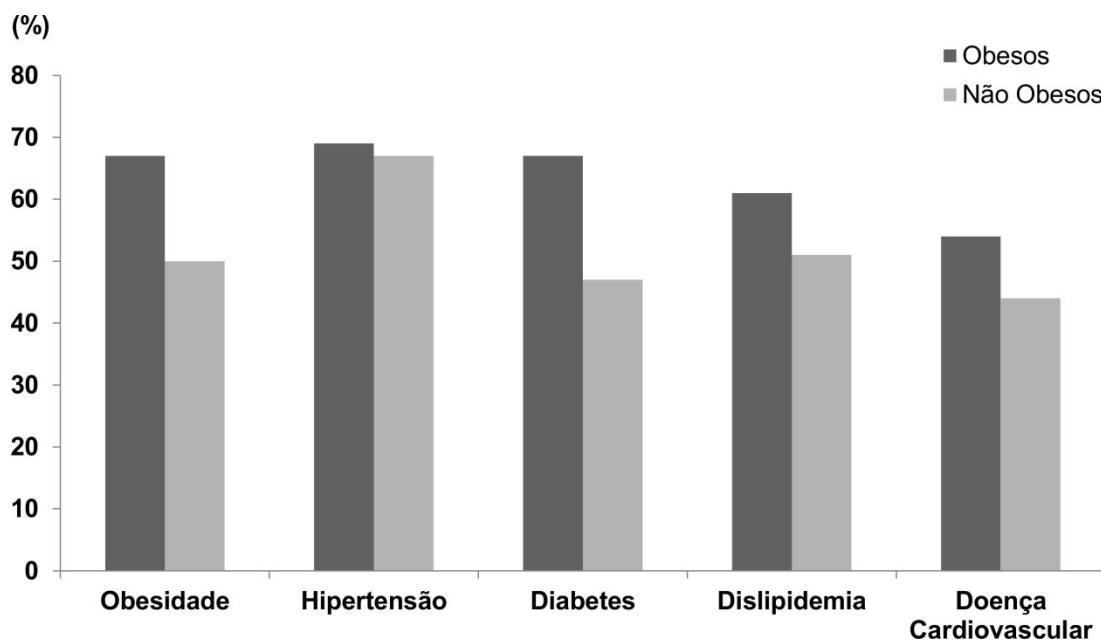


Figura 11 – História familiar dos componentes da síndrome metabólica entre os adultos obesos e não obesos com 21-OHD.

5.2.1 Impacto dos Polimorfismos nos Genes *NR3C1* e *HSD11B1* Sobre o Perfil Metabólico de Adultos com 21-OHD

A frequência alélica dos polimorfismos *BclI*, A3669G e 4436InsA esteve em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O polimorfismo *BclI* foi encontrado em 26,4% dos alelos, em 6 pacientes em homozigose e 24 em heterozigose. O polimorfismo A3669G foi encontrado em 9,6% dos alelos, em homozigose em 1 paciente e em heterozigose em 11 pacientes. A variante 4436InsA foi identificada em 18,4% dos alelos, sendo que 23 pacientes apresentaram o polimorfismo heterozigose e apenas um em homozigose. Os polimorfismos N363S e ER22/23EK foram identificados em apenas um paciente, cada um, em heterozigose. Para análise estatística, selecionamos apenas polimorfismos com frequência alélica $\geq 5\%$ (*BclI*, A3669G e 4436InsA).

Considerando que as variantes A3669G e 4436InsA foram identificadas em homozigose em apenas um paciente, todos os indivíduos foram considerados “carreadores” (heterozigoto e homozigoto).

As variantes estudadas no grupo de adultos com 21-OHD e suas respectivas frequências alélicas nesta casuística e nas populações Caucasiana, Africana e Asiática estão descritas na Tabela 9.

Tabela 9 – Frequência alélica das variantes encontradas nos genes *NR3C1* e *HSD11B1* em adultos com 21-OHD e nas populações Caucasiana, Africana e Asiática.

Gene	Polimorfismo	Localização	NCBI	Frequência alélica (%)			
				21-OHD*	Caucasiano ¹	Africanos ¹	Asiáticos ¹
<i>NR3C1</i>	<i>Bcll</i>	Íntron 2	rs41423247	26,4	28,9 ¹	20,2 ¹	32,8 ¹
	A3669G	Exon 9β	rs6198	9,6	17	4	0
	N363S	Exon 2	rs6195	0,7	3,1	0,5	ND
	ER22/23EK	Exon 2	rs6189/6190	0,7	3,0	0	0
<i>HSD11B1</i>	4436InsA	Íntron 3	rs12086634	18,4	21	18	22

*Presente estudo

¹ HAPMAP (Ensembl)

A comparação dos dados clínicos e laboratoriais dos carreadores e não carreadores do polimorfismo *Bcll* é apresentada na Tabela 10. Pacientes carreadores do polimorfismo *Bcll* tiveram maior IMC, circunferência abdominal e PAS quando comparados aos carreadores do alelo selvagem na análise univariada. Estes resultados foram ajustados de acordo com o sexo e idade e permaneceram estatisticamente significante (Tabela 10). Foi também observado que pacientes heterozigotos para o alelo *Bcll* apresentaram maior IMC ($29 \text{ kg/m}^2 \pm 5,3$ vs. $23,9 \text{ kg/m}^2 \pm 2,7 P = 0,03$), circunferência abdominal ($89 \text{ cm} \pm 12,7$ vs. $72,8 \text{ cm} \pm 5,6 P = 0,005$) e concentrações séricas de

triglicérides ($91,3 \text{ mg/dL} \pm 45,5$ vs. $50,7 \text{ mg/dL} \pm 27,8$, $P = 0,009$) quando comparados aos carreadores homozigotos do alelo *BclI*.

Não foram observadas diferenças significantes no HOMA-IR e perfil lipídico entre os carreadores e não carreadores do polimorfismo *BclI* (Tabela 10).

Tabela 10 – Influência do polimorfismo *BclI* sobre o perfil metabólico de pacientes adultos com a deficiência da 21-hidroxilase.

Variáveis	Genótipo			Valor de P^*	Valor de P ajustado [#]
	<i>BclI</i> (homozigoto) n = 6	<i>BclI</i> (heterozigoto) n = 24	Alelo Selvagem n = 38		
IMC, média ± DP, kg/m ²	23,9 (2,7)	29 (5,3)	26 (5,3)	0,018	0,044
Circunferência abdominal, média ± DP, cm	72,8 (5,6)	89 (12,7)	81 (13)	0,011	0,044
Dose de GC, média ± DP, mg/m ²	11,2 (4,4)	9,9 (3,7)	11,6 (4,6)	0,137	0,164
Duração do tratamento, média ± DP, anos	22 (5,5)	25,6 (9,5)	25,4 (10,8)	0,240	0,461
HOMA-IR, média ± DP	2,3 (1,5)	2,3 (1,4)	2,4 (1,2)	0,452	0,854
Colesterol total, média ± DP, mg/dL	159,2 (27,2)	177 (39)	180,9 (32,8)	0,669	0,728
HDL-c, média ± DP, mg/dL	63 (15,5)	52 (14,4)	56,5 (12,2)	0,111	0,216
LDL-c, média ± DP, mg/dL	86 (19,6)	106,3 (30,6)	107,3 (27,8)	0,224	0,901
Triglicérides, média ± DP, mg/dL	50,7 (27,8)	91,3 (45,5)	87,4 (42,2)	0,009	0,828
PAS, média ± DP, mmHg	123 (6,7)	124,9 (7,1)	116,7 (8,9)	<0,001	0,008
PAD, média ± DP, mmHg	75,3 (5,6)	80,1 (7,1)	76,8 (6,5)	0,064	0,179

* Análise univariada

Ajustado para sexo, idade e forma clínica

IMC, índice de massa corporéa; DP, desvio padrão; GC, glicocorticoide, HDL-c, lipoproteína de alta densidade; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica.

A frequência do polimorfismo *BclI* foi maior em pacientes obesos quando comparada aos pacientes não obesos (69% vs. 34%, respectivamente. $P = 0,058$), e a frequência foi também elevada em pacientes apresentando síndrome metabólica (80% vs. 43%, respectivamente. $P = 0,218$); contudo, estas diferenças não foram estatisticamente significantes.

A Tabela 11 apresenta a comparação dos dados clínicos e laboratoriais dos carreadores e não carreadores do polimorfismo A3669G. Não houve diferença estatisticamente significante nos fatores de risco para síndrome metabólica, tais como IMC, circunferência abdominal, pressão sanguínea, HOMA e perfil lipídico. Além disso, não houve diferença significante na frequência do polimorfismo A3669G entre pacientes obesos e não obesos com 21-OHD (13% vs. 17%, respectivamente. $P = 0,992$), ou entre pacientes com e sem síndrome metabólica (20% vs. 17%, respectivamente. $P = 0,641$).

Tabela 11 – Impacto do polimorfismo A3669G sobre o perfil metabólico de pacientes com a deficiência da 21-hidroxilase.

Variáveis	Genótipo		Valor de P^*	Valor de P ajustado
	A3669G n = 12	Alelo Selvagem n = 56		
IMC, média ± DP, kg/m ²	26,8 (5)	26,8 (5,5)	0,942	0,974
Circunferência abdominal, média ± DP, cm	83,3 (12,2)	83 (13,5)	0,797	0,997
Dose de GC, média ± DP, mg/m ²	10,6 (5)	11,1 (4,2)	0,727	0,947
Duração do tratamento, média ± DP, anos	22,8 (12,1)	25,6 (9,4)	0,631	0,621
HOMA-IR, média ± DP	2,1 (0,7)	2,4 (1,4)	0,427	0,594
Colesterol total, média ± DP, mg/dL	192,7 (24,4)	174,4 (35,9)	0,097	0,192
HDL-c, média ± DP, mg/dL	58,8 (9,5)	54,8 (14,1)	0,346	0,370
LDL-c, média ± DP, mg/dL	115,6 (28,1)	102,8 (28,3)	0,161	0,219
Triglicérides, média ± DP, mg/dL	88,6 (35,1)	84,9 (45,1)	0,398	0,897
PAS, média ± DP, mmHg	121,5 (13,2)	119,8 (7,9)	0,600	0,718
PAD, média ± DP, mmHg	78,5 (8)	77,7 (6,5)	0,708	0,974

IMC, índice de massa corpórea; DP, desvio padrão; GC, glicocorticoide, HDL-c, lipoproteína de alta densidade; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica.

A comparação dos dados clínicos e laboratoriais dos carreadores e não carreadores do polimorfismo 4436InsA está descrita na Tabela 12. Conforme podemos observar, não houve diferença estatisticamente significante nos fatores de risco para síndrome metabólica, tais como IMC, circunferência

abdominal, pressão sanguínea, HOMA e perfil lipídico. Similarmente ao que foi observado no grupo de pacientes jovens, a frequência do polimorfismo 4436InsA, foi menor nos pacientes com obesidade em relação aos não obesos (19% vs. 41%, respectivamente $P = 0,226$) e em pacientes com síndrome metabólica quando comparados aos sem a SM (20% vs. 33%, respectivamente. $P = 0,797$). Todavia, esta diferença não foi estatisticamente significante.

Tabela 12 – Impacto do polimorfismo 4436InsA sobre o perfil metabólico de pacientes adultos com a deficiência da 21-hidroxilase

Variáveis	Genótipo		Valor de P^*	Valor de P ajustado [#]
	HSD11B1 n = 24	Alelo Selvagem n = 42		
IMC, média ± DP, kg/m ²	25,1 (4,2)	27,6 (5,9)	0,098	0,197
Circunferência abdominal, média ± DP, cm	79,7 (9,7)	85,1 (14,6)	0,252	0,251
Dose de GC, média ± DP, mg/m ²	10,4 (4,8)	11,4 (3,9)	0,219	0,414
Duração do tratamento, média ± DP, anos	23,6 (11)	25,9 (9,2)	0,876	0,628
HOMA-IR, média ± DP	2,25 (0,70)	2,48 (1,52)	0,791	0,782
Colesterol total, média ± DP, mg/dL	173,8 (31,1)	179,5 (37,1)	0,525	0,652
HDL-c, média ± DP, mg/dL	58,7 (13,6)	53,3 (13,1)	0,117	0,256
LDL-c, média ± DP, mg/dL	97,8 (24,4)	109,2 (30,3)	0,118	0,246
Triglicérides, média ± DP, mg/dL	82,5 (39,5)	87,2 (46,1)	0,937	0,920
PAS, média ± DP, mmHg	118,1 (9,6)	121,4 (8,5)	0,325	0,275
PAD, média ± DP, mmHg	77,3 (6,7)	78,2 (6,8)	0,597	0,894

* Análise univariada

Ajustado para sexo, idade e forma clínica

IMC, índice de massa corpórea; DP, desvio padrão; GC, glicocorticoide, HDL-c, lipoproteína de alta densidade; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica

6. DISCUSSÃO

A introdução da terapia de reposição hormonal com glicocorticoides há 60 anos possibilitou uma vida normal aos pacientes portadores da deficiência da 21-hidroxilase (3); contudo, atenção especial passou a ser dada aos eventos adversos associados ao hiperandrogenismo crônico, assim como aqueles decorrentes da terapia crônica com glicocorticoides, os quais impactam negativamente o perfil clínico e metabólico dos pacientes com 21-OHD (12, 75-78).

Pacientes com 21-OHD estão sob o risco de desenvolver sinais e sintomas de Síndrome de Cushing iatrogênica (3, 79, 80), uma vez que as formulações de glicocorticoides existentes não conseguem mimetizar o ritmo circadiano da secreção do cortisol. Além disso, devido ao estreito intervalo entre as doses de reposição fisiológica com glicocorticoides e aquelas que suprimem o hiperandrogenismo, isto faz com que doses suprafisiológicas sejam comumente utilizadas. Assim, como o hipercortisolismo é associado com morbidade cardiovascular (81), dados da literatura sugerem que pacientes com 21-OHD em terapia hormonal podem apresentar um perfil cardiovascular adverso (77). O hiperandrogenismo é outro fator que pode colaborar para o desenvolvimento da síndrome metabólica, tanto no período pós-natal quanto na programação fetal de doenças na vida adulta (82).

A maioria dos estudos disponíveis encontrou aumento do IMC em adultos e crianças com 21-OHD (15, 17, 26, 27, 30, 32, 83-87); entretanto, outros trabalhos não identificaram aumento da prevalência de obesidade (22, 23, 88, 89). Existem dificuldades na comparação dos estudos

supracitados, uma vez que envolvem casuísticas heterogêneas, que utilizaram diferentes metas no controle hormonal e diferentes glicocorticoides.

É extensamente debatido se a exposição crônica ou doses elevadas de glicocorticoides são fatores contribuintes para o desenvolvimento da síndrome metabólica em 21-OHD (77). Em um estudo multicêntrico realizado no Reino Unido, alta prevalência de obesidade foi observada nos pacientes adultos com 21-OHD (41% dos casos) em comparação com a população de referência. Contudo, além destes pacientes terem recebido diferentes regimes de glicocorticoides, valores suprimidos de 17OHP (< 12 nmol/L) foram observados em 45% e 37% das mulheres e homens com 21-OHD, respectivamente (27); assim, doses elevadas de GC contribuem com o desenvolvimento da obesidade e demais comorbidades metabólicas observadas.

Embora nossos pacientes tenham sido selecionados e acompanhados em um único centro, em regime de tratamento homogêneo e com controle hormonal dos andrógenos, também identificamos elevada frequência de obesidade quando comparada à população normal da mesma região, tanto em adultos como em crianças e adolescentes (90, 91).

O controle da terapia de reposição hormonal em nossos pacientes foi basicamente a normalização da concentração dos andrógenos, e não da 17OHP. Dessa forma, a média das concentrações da 17OHP de nossos pacientes adultos foi maior (175,2 nmol/L) do que as observadas no estudo

do Reino Unido, fato que sugere que a dose de GC deva ter sido menor nos nossos pacientes.

Similarmente, em outra coorte acompanhada na Tunísia que avaliou 26 pacientes adultos com as formas clássica e não clássica da 21-OHD, em regime de tratamento com hidrocortisona e/ou dexametasona, também encontrou elevada prevalência de obesidade (30,7%). Vale a pena ressaltar que um dos critérios de controle hormonal deste estudo objetivou baixos valores da 17OHP.

Aumento da prevalência de obesidade também tem sido observado em pacientes com 21-OHD em fases precoces do desenvolvimento (15); interessantemente, assim como observado em nosso estudo, esta prevalência não apresenta correlação com a dose e o tempo de tratamento. Embora o estudo supracitado tenha envolvido a utilização de três GC diferentes, os autores não observaram diferenças no IMC de pacientes em uso dos glicocorticoides de curta, média e longa ação, assim como na nossa casuística, uma vez que não identificamos diferenças no IMC entre os pacientes jovens recebendo acetato de cortisona e dexametasona.

A literatura sugere que os valores da circunferência abdominal, bem como a relação cintura/quadril são considerados melhores preditores de desfechos metabólicos adversos quando comparados ao IMC (92). Trabalhos recentes apontam para uma similaridade da circunferência abdominal e relação cintura/quadril de pacientes com 21-OHD na comparação com os indivíduos controles pareados com idade inferior a 30 anos (21, 22). Entretanto, nos pacientes com idade superior a 30 anos os

valores foram superiores, tanto em mulheres quanto nos homens com 21-OHD. Contudo, o controle da terapia de reposição hormonal envolveu a normalização das concentrações de 17-OHP. Similarmente aos achados de Falhamamar *et al* (21, 22), observamos que os valores da circunferência abdominal foram similares entre os jovens com 21-OHD e os controles pareados para idade, sexo e IMC (91), evidenciando o efeito da obesidade *per si* no aumento do risco cardiovascular.

Os dados sobre os desfechos metabólicos em pacientes com 21-OHD são divergentes na literatura (75, 76); trabalho que avaliou o perfil metabólico em 61 mulheres com 21-OHD não demonstrou evidências da elevação de fatores de risco cardiovascular. Apesar disso, um aumento do tecido adiposo e elevadas concentrações de insulina foram observadas em pacientes com idade superior a 30 anos (21).

Outro resultado interessante em nosso trabalho foi o fato de que crianças e adolescentes com a forma perdedora de sal apresentaram pior perfil metabólico quando comparados aos pacientes com a forma virilizante simples, independentemente do sexo e idade (91). Hipotetizamos que este achado possa estar relacionado ao início mais precoce do tratamento nos pacientes com a forma PS; além disso, não podemos descartar uma tendência ao supertratamento nestes pacientes em fases precoces do desenvolvimento.

Em nosso estudo observamos que 14,6% das crianças e adolescentes apresentaram síndrome metabólica de acordo com o critério NCEP-ATPIII, adaptado ao grupo pediátrico; frequência maior do que a

população de referência, de mesma faixa etária e região (93). Quanto aos adultos, observamos síndrome metabólica em 7,3% dos casos, cuja frequência foi similar à observada na população de referência (93). O aumento da prevalência dos componentes da SM na infância pode refletir uma maior dificuldade no controle da terapia nesta faixa etária, com tentativas de supressão dos andrógenos para não comprometer o potencial de altura final, o que pode ter como consequência uma elevação da prevalência de comorbidades metabólicas.

A prevalência de diabetes tipo 2 não está elevada em pacientes com 21-OHD, mas um aumento da razão de diabetes gestacional têm sido descrito (21, 31). Resistência à insulina tem sido avaliada por diferentes métodos, onde o mais empregado é o HOMA (23-27, 29, 30, 32-35), no geral identifica-se aumento da resistência à insulina nos pacientes com 21-OHD (22-24, 29, 32, 34, 37). Falhammar *et al* (21, 22) encontraram insensibilidade à insulina apenas em pacientes com idade superior a 30 anos, mesmo na comparação de mulheres não obesas comparadas aos controles não obesos. Em contraste, homens adultos não obesos apresentaram sensibilidade similar aos controles não obesos (22); vale a pena ressaltar que o tamanho da amostra não era significativo ($n = 30$). Nossos achados estão em linha com a literatura, onde os jovens com 21-OHD apresentaram maior valor do HOMA quando comparados aos controles pareados para a idade, sexo e IMC (91). Assume-se que a reposição suprafisiológica com GC é a razão para o aumento da resistência à insulina em indivíduos com 21-OHD (75). No entanto, andrógenos

elevados em mulheres, assim como baixos valores de testosterona em homens também podem levar à resistência à insulina (94, 95); dessa forma, o subtratamento é outro fator que pode aumentar a resistência à insulina.

Nossos achados em pacientes jovens (91) e em adultos com 21-OHD demonstraram frequência similar de dislipidemia em relação à população de referência, de mesma faixa etária e região (93). No grupo de pacientes jovens, a presença de dislipidemia esteve fortemente associada à presença de obesidade (31,7% obesas); assim como observado no nosso grupo de controles (91). Estes dados sugerem um papel da obesidade nos desfechos adversos do tratamento da 21-OHD.

Similarmente aos nossos resultados, outros estudos não mostraram diferenças significativas na comparação com os controles (21-24). Entretanto, Arlt *et al* (27) reportaram aumento da frequência de dislipidemia em pacientes adultos com 21-OHD, enquanto que em pacientes jovens pior perfil lipídico foi associado ao uso de GC de média ação (prednisona) (28).

Com relação à frequência de hipertensão em pacientes com 21-OHD os trabalhos têm demonstrado resultados divergentes (21-25, 27, 33, 38-43); no grupo pediátrico, a pressão sanguínea apresentou-se normal no primeiro ano de vida (42), tendo sido descrita uma prevalência de 6,6% (43). Nossos achados são similares, uma vez que identificamos uma prevalência de 10% nos jovens com 21-OHD, sem diferenças significantes quando comparados aos controles pareados (91). De acordo com trabalhos previamente publicados (38, 41), também identificamos que os níveis pressóricos se correlacionaram com grau de obesidade (91). No grupo

adulto, os valores de pressão sanguínea são similares aos controles (24), mesmo quando se divide por sexo e por faixa etária, antes e após 30 anos (21, 22). Similarmente, na nossa amostra de adultos a prevalência de hipertensão foi de 12%, não diferindo da população de referência (90). Dentre os trabalhos que encontraram maior prevalência de hipertensão, destacamos o estudo multicêntrico do Reino Unido (27), no qual a prevalência de obesidade também foi elevada, e o estudo de pacientes não tratados, sugerindo que concentrações elevadas de andrógenos contribuem para o aumento dos componentes da síndrome metabólica (25, 30).

Supomos que os dados discordantes supracitados possam ser decorrentes da utilização de diferentes regimes de tratamento e critérios para controle hormonal, tamanhos de amostras, assim como o uso de diferentes critérios para definição de fatores de risco cardiovascular (22, 27, 76).

Na população geral, dados epidemiológicos sugerem que há um importante componente familiar na prevalência da obesidade e dos componentes da síndrome metabólica (96-99). Em crianças com 21-OHD foi observado que o risco de obesidade foi显著emente maior nas crianças com pais obesos, quando comparados àquelas com pais de peso normal (15). Este dado foi reproduzido em nossa amostra, nossos pacientes obesos dos grupos pediátrico e adulto também apresentaram maior frequência de história familiar de comorbidades metabólicas na comparação com os pacientes de peso normal.

Assim como ocorre na população geral, outros fatores além da obesidade, hipertensão, predisposição familiar, podem estar envolvidos com o aumento do risco cardiovascular na 21-OHD, tais como fatores ambientais e predisposição genética (90, 91), para qual se observa influência de polimorfismos dos genes do receptor de glicocorticoide e da enzima 11 β HSD1.

O polimorfismo *BclI*, um dos mais estudados do gene *NR3C1*, é associado ao aumento da sensibilidade aos glicocorticoides e, consequentemente, ao aumento do IMC e circunferência abdominal (56, 100-102), concentrações lipídicas (103) e da pressão arterial (103, 104). Todavia, até o presente trabalho, o impacto destes polimorfismos sobre o perfil metabólico em pacientes com 21-OHD não tinha sido avaliado (90).

Realizamos a análise de associação entre os polimorfismos dos genes *NR3C1* e *HSD11B1* e os tradicionais fatores de risco cardiovascular em pacientes com 21-OHD, com controle similar da terapia hormonal. Assim como observado na população normal, os pacientes carreadores do alelo *BclI* apresentaram maior IMC e circunferência abdominal, em relação aos carreadores do alelo selvagem, independentemente do sexo, idade e forma clínica (Tabela 10). Adicionalmente, a frequência do polimorfismo *BclI* foi maior nos pacientes obesos quando comparados aos não obesos; entretanto, não houve significância estatística.

O alelo *BclI* também tem sido associado a maiores valores pressóricos e/ou maior prevalência de hipertensão na população geral (104). Similarmente, nossos pacientes adultos carreadores deste alelo

apresentaram maiores valores de pressão arterial sistólica (90); supomos que este resultado não foi influenciado pelo uso da terapia com dexametasona, uma vez que este glicocorticoide tem pouco efeito mineralocorticoide (105). Baseado em nossa análise estatística, o polimorfismo *BclI* e o IMC foram os principais fatores que influenciaram a pressão sanguínea no grupo de adultos.

O fato dos pacientes adultos carreadores do alelo *BclI* em heterozigose apresentarem maior IMC, circunferência abdominal e pressão arterial sistólica, comparados ao grupo carreador do alelo homozigoto (mutante e selvagem), está de acordo com os dados da literatura na população geral, onde indivíduos carreadores em heterozigose ganharam mais do que o dobro da adiposidade subcutânea quando comparado aos indivíduos homozigotos (100). Como previamente hipotetizado por Tremblay *et al.* (100), este fenômeno pode ser explicado por um possível desequilíbrio de ligação entre o polimorfismo *BclI* e outros localizados na região regulatória do gene *NR3C1*, os quais poderiam influenciar o fenótipo observado.

Considerando que o polimorfismo *BclI* se associa com o aumento da atividade de transativação do receptor de glicocorticoide, podemos supor que seus carreadores poderiam necessitar de menor dose de glicocorticoide para se obter o adequado controle hormonal, dado que foi observado no nosso grupo de adultos (Tabela 10); mas provavelmente, devido ao tamanho da amostra, este resultado não foi estatisticamente significante. Suportando esta hipótese, trabalho prévio observou que os carreadores

deste alelo e portadores de doença inflamatória intestinal apresentaram melhor resposta à terapia quando comparados aos não carreadores (106).

Com relação ao polimorfismo A3669G, o mesmo tem sido associado ao aumento da expressão e estabilização da isoforma 9 β do receptor de glicocorticoide, que é associada à resistência aos glicocorticoides. Embora esta variante acarrete resistência aos glicocorticoides, trabalho recente identificou um importante papel sobre o risco cardiovascular, uma grande coorte de pacientes idosos carreadores deste alelo apresentou aumento das concentrações plasmáticas de parâmetros inflamatórios, tais como proteína C reativa e interleucina-6 (61). Embora no nosso estudo os pacientes adultos carreadores deste polimorfismo tenham apresentado similar IMC aos dos não carreadores, as concentrações de colesterol total, LDL-c e triglicérides foram maiores no grupo dos carreadores. Todavia este achado não foi estatisticamente significante, provavelmente pelo tamanho da amostra (Tabela 11). Por outro lado, no grupo de crianças e adolescentes, este achado apresentou diferença significativa, os carreadores desta variante apresentaram maiores concentrações de LDL-c quando comparados aos não carreadores (Tabela 5).

Com relação ao polimorfismo 4436InsA do gene *HSD11B1*, estudos *in vitro* observaram uma redução de atividade enzimática de 2,5 vezes quando comparado ao alelo selvagem, o que sugere que a região que contém o polimorfismo pode atuar como potencializadora da expressão gênica. Consequentemente, hipotetizamos que este polimorfismo poderia modular o perfil metabólico dos pacientes com 21-OHD, através da melhora

do perfil metabólico, uma vez que esta variante acarreta menor conversão de cortisona para cortisol. Embora estatisticamente não significante, observamos uma tendência de melhor perfil metabólico, caracterizado por menor IMC, perfil lipídico favorável e melhores níveis pressóricos nos carreadores desta variante, tanto nos jovens como em adultos com 21-OHD (Tabelas 6 e 12, respectivamente). Adicionalmente, também especulamos se esta variante poderia influenciar a dose de GC; observamos uma tendência de seus carreadores necessitarem de maiores doses quando comparado aos não carreadores.

Nossos achados indicam que a exposição crônica ao glicocorticoide e a predisposição genética corroboram para maior prevalência de obesidade com 21-OHD e predispõem a um perfil metabólico adverso. Como esperado, o IMC apresentou significante influência sobre os valores do HOMA-IR, concentrações lipídicas e pressão sanguínea em ambos os grupos de pacientes (jovens e adultos).

Nosso estudo sugere que o polimorfismo *BclI* possa desempenhar importante papel na suscetibilidade à obesidade e hipertensão em adultos com 21-OHD, e que o alelo A3669G se associa a um pior perfil lipídico nas crianças e adolescentes; indicando que diferenças na sensibilidade e resposta individual ao tratamento com glicocorticoides são, no mínimo, parcialmente geneticamente determinada (107). Dessa forma, provavelmente no futuro, o estudo dos genes *NR3C1* e *HSD11B1* durante o tratamento da 21-OHD possa auxiliar na qualidade da terapia de reposição

hormonal com GC, por meio da identificação de grupos de pacientes de risco que se beneficiariam de terapia personalizada.

7. CONCLUSÕES

Em nosso estudo de avaliação do perfil clínico e metabólico de pacientes com a deficiência da 21-hidroxilase e na análise do papel dos genes *NR3C1* e *HSD11B1* sobre a prevalência de obesidade e demais comorbidades metabólicas observamos que:

- 1) Pacientes com 21-OHD apresentaram maior prevalência de obesidade em comparação com a população de referência, que foi independente da dose e do tipo de glicocorticoide e do tempo de tratamento;
- 2) Pacientes obesos com 21-OHD, assim como ocorre na população geral, apresentaram pior perfil metabólico quando comparados aos pacientes não obesos;
- 3) A prevalência de síndrome metabólica no grupo de pacientes jovens foi maior do que a população de referência;
- 4) Pacientes obesos com 21-OHD apresentaram maior frequência de história familiar dos componentes da síndrome metabólica quando comparados aos pacientes não obesos, o que sugere a influência de fatores genéticos e/ou ambientais;
- 5) Nesta série, a distribuição alélica das variantes dos genes *NR3C1* e *HSD11B1* foi semelhante às previamente referidas na literatura;

- 6) A variante 4436InsA-*HSD11B1* não influenciou o perfil clínico e metabólico dos pacientes desta casuística;
- 7) A variante *Bcll-NR3C1* foi associada à obesidade e a hipertensão nos pacientes adultos;
- 8) A variante A3669G-*NR3C1* foi associada à elevadas concentrações de LDL-c nos pacientes pediátricos;
- 9) Nossos dados sugerem que a obesidade e perfil metabólico adverso em pacientes com 21-OHD é parcialmente geneticamente determinados.

8. REFERÊNCIAS

1. Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev.* 1988;9(3):295-318.
2. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev.* 32(1):81-151.
3. White PC, Bachega TA. Congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency: from birth to adulthood. *Semin Reprod Med.* 30(5):400-9.
4. Pang SY, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon IC, et al. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics.* 1988;81(6):866-74.
5. Therrell BL, Jr., Berenbaum SA, Manter-Kapanke V, Simmank J, Korman K, Prentice L, et al. Results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics.* 1998;101(4 Pt 1):583-90.
6. Silveira EL, Elnecave RH, dos Santos EP, Moura V, Pinto EM, van der Linden Nader I, et al. Molecular analysis of CYP21A2 can optimize the follow-up of positive results in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Clin Genet.* 2009;76(6):503-10.
7. Hayashi G, Faure C, Brondi MF, Vallejos C, Soares D, Oliveira E, et al. Weight-adjusted neonatal 17OH-progesterone cutoff levels improve the efficiency of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 55(8):632-7.

8. Torres N, Mello MP, Germano CM, Elias LL, Moreira AC, Castro M. Phenotype and genotype correlation of the microconversion from the CYP21A1P to the CYP21A2 gene in congenital adrenal hyperplasia. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]. 2003;36(10):1311-8.
9. Whitehead FJ, Couper RT, Moore L, Bourne AJ, Byard RW. Dehydration deaths in infants and young children. Am J Forensic Med Pathol. 1996;17(1):73-8.
10. Bachega TA, Madureira G, Brenlha EML, Ueti RC, Inácio M, Denis FT, et al. Tratamento da hiperplasia supra-renal congênita por deficiência da 21-hidroxilase. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2001;45:64-72.
11. Bachega TA, Billerbeck AE, Marcondes JA, Madureira G, Arnhold IJ, Mendonca BB. Influence of different genotypes on 17-hydroxyprogesterone levels in patients with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Clin Endocrinol (Oxf). 2000;52(5):601-7.
12. Cordeiro GV, Silva IN, Goulart EM, Chagas AJ, Kater CE. Final height in congenital adrenal hyperplasia: the dilemma of hypercortisolism versus hyperandrogenism. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2013;57(2):126-31.
13. Caldato MC, Fernandes VT, Kater CE. One-year clinical evaluation of single morning dose prednisolone therapy for 21-hydroxylase deficiency. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2004;48(5):705-12.
14. Leite FM, Longui CA, Kochi C, Faria CD, Borghi M, Calliari LE, et al. [Comparative study of prednisolone versus hydrocortisone acetate for

- treatment of patients with the classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency]. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2008;52(1):101-8.
15. 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.
 16. Knorr D, Hinrichsen de Lienau SG. Persistent obesity and short final height after corticoid overtreatment for congenital adrenal hyperplasia (CAH) in infancy. Acta Paediatr Jpn. 1988;30 Suppl:89-92.
 17. Corneau RE, Hindmarsh PC, Brook CG. Obesity in 21-hydroxylase deficient patients. Arch Dis Child. 1998;78(3):261-3.
 18. Stikkelbroeck NM, Van't Hof-Grootenboer BA, Hermus AR, Otten BJ, Van't Hof MA. Growth inhibition by glucocorticoid treatment in salt wasting 21-hydroxylase deficiency: in early infancy and (pre)puberty. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(8):3525-30.
 19. Brook CG, Zachmann M, Prader A, Murset G. Experience with long-term therapy in congenital adrenal hyperplasia. J Pediatr. 1974;85(1):12-9.
 20. Girgis R, Winter JS. The effects of glucocorticoid replacement therapy on growth, bone mineral density, and bone turnover markers in children with congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab. 1997;82(12):3926-9.
 21. Falhammar H, Filipsson H, Holmdahl G, Janson PO, Nordenskjold A, Hagenfeldt K, et al. Metabolic profile and body composition in adult women with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab. 2007;92(1):110-6.

22. Falhammar H, Filipsson Nystrom H, Wedell A, Thoren M. Cardiovascular risk, metabolic profile, and body composition in adult males with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Eur J Endocrinol.* 164(2):285-93.
23. Williams RM, Deeb A, Ong KK, Bich W, Murgatroyd PR, Hughes IA, et al. Insulin sensitivity and body composition in children with classical and nonclassical congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf).* 72(2):155-60.
24. 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. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(3):1015-8.
25. Mooij CF, Kroese JM, Sweep FC, Hermus AR, Tack CJ. Adult patients with congenital adrenal hyperplasia have elevated blood pressure but otherwise a normal cardiovascular risk profile. *PLoS One.* 6(9):e24204.
26. Bachelot A, Plu-Bureau G, Thibaud E, Laborde K, Pinto G, Samara D, et al. Long-term outcome of patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Horm Res.* 2007;67(6):268-76.
27. 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. *J Clin Endocrinol Metab.* 95(11):5110-21.
28. Botero D, Arango A, Danon M, Lifshitz F. Lipid profile in congenital adrenal hyperplasia. *Metabolism.* 2000;49(6):790-3.

29. Zimmermann A, Grigorescu-Sido P, AlKhzouz C, Patberg K, Bucerzan S, Schulze E, et al. Alterations in lipid and carbohydrate metabolism in patients with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Horm Res Paediatr.* 74(1):41-9.
30. Zhang HJ, Yang J, Zhang MN, Liu CQ, Xu M, Li XJ, et al. Metabolic disorders in newly diagnosed young adult female patients with simple virilizing 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine.* 38(2):260-5.
31. Hagenfeldt K, Janson PO, Holmdahl G, Falhammar H, Filipsson H, Frisen L, et al. Fertility and pregnancy outcome in women with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Reprod.* 2008;23(7):1607-13.
32. Volkl TM, Simm D, Korner A, Rascher W, Kiess W, Kratzsch J, et al. Does an altered leptin axis play a role in obesity among children and adolescents with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency? *Eur J Endocrinol.* 2009;160(2):239-47.
33. Falhammar H, Filipsson H, Holmdahl G, Janson PO, Nordenskjold A, Hagenfeldt K, et al. Increased liver enzymes in adult women with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr J.* 2009;56(4):601-8.
34. Charmandari E, Weise M, Bornstein SR, Eisenhofer G, Keil MF, Chrousos GP, et al. Children with classic congenital adrenal hyperplasia have elevated serum leptin concentrations and insulin resistance: potential clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(5):2114-20.

35. Bayraktar F, Dereli D, Ozgen AG, Yilmaz C. Plasma homocysteine levels in polycystic ovary syndrome and congenital adrenal hyperplasia. *Endocr J.* 2004;51(6):601-8.
36. Kroese JM, Mooij CF, van der Graaf M, Hermus AR, Tack CJ. Pioglitazone improves insulin resistance and decreases blood pressure in adult patients with congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol.* 2009;161(6):887-94.
37. Paula FJ, Gouveia LM, Paccola GM, Piccinato CE, Moreira AC, Foss MC. Androgen-related effects on peripheral glucose metabolism in women with congenital adrenal hyperplasia. *Horm Metab Res.* 1994;26(11):552-6.
38. 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. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(12):4888-95.
39. de Silva KS, Kanumakala S, Brown JJ, Jones CL, Warne GL. 24-hour ambulatory blood pressure profile in patients with congenital adrenal hyperplasia--a preliminary report. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2004;17(8):1089-95.
40. Hoepffner W, Herrmann A, Willgerodt H, Keller E. Blood pressure in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2006;19(5):705-11.
41. Roche EF, Charmandari E, Dattani MT, Hindmarsh PC. Blood pressure in children and adolescents with congenital adrenal hyperplasia (21-

- hydroxylase deficiency): a preliminary report. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003;58(5):589-96.
42. Mooij CF, Kapusta L, Otten BJ, Claahsen-van der Grinten HL. Blood pressure in the first year of life in children with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: a pilot study. *Horm Res Paediatr*. 2005;74(5):328-32.
43. Nebesio TD, Eugster EA. Observation of hypertension in children with 21-hydroxylase deficiency: a preliminary report. *Endocrine*. 2006;30(3):279-82.
44. Leslie BR. Metabolic syndrome: historical perspectives. *Am J Med Sci*. 2005;330(6):264-8.
45. Filipovsky J, Ducimetiere P, Eschwege E, Richard JL, Rosselin G, Claude JR. The relationship of blood pressure with glucose, insulin, heart rate, free fatty acids and plasma cortisol levels according to degree of obesity in middle-aged men. *J Hypertens*. 1996;14(2):229-35.
46. Rosmond R, Dallman MF, Bjorntorp P. Stress-related cortisol secretion in men: relationships with abdominal obesity and endocrine, metabolic and hemodynamic abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(6):1853-9.
47. Walker BR, Phillips DI, Noon JP, Panarelli M, Andrew R, Edwards HV, et al. Increased glucocorticoid activity in men with cardiovascular risk factors. *Hypertension*. 1998;31(4):891-5.
48. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005;365(9468):1415-28.

49. Misra M, Bredella MA, Tsai P, Mendes N, Miller KK, Klibanski A. Lower growth hormone and higher cortisol are associated with greater visceral adiposity, intramyocellular lipids, and insulin resistance in overweight girls. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295(2):E385-92.
50. Sen Y, Aygun D, Yilmaz E, Ayar A. Children and adolescents with obesity and the metabolic syndrome have high circulating cortisol levels. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008;29(1):141-5.
51. Anagnostis P, Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(8):2692-701.
52. Davies WA, Luo H, Dong KW, Albrecht ED, Pepe GJ. Cloning and expression of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene in the baboon. *Mol Cell Endocrinol.* 1997;127(2):201-9.
53. Gelernter-Yaniv L, Feng N, Sebring NG, Hochberg Z, Yanovski JA. Associations between a polymorphism in the 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase type I gene and body composition. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27(8):983-6.
54. Draper N, Walker EA, Bujalska IJ, Tomlinson JW, Chalder SM, Arlt W, et al. Mutations in the genes encoding 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase interact to cause cortisone reductase deficiency. *Nat Genet.* 2003;34(4):434-9.
55. Rousseau GG, Baxter JD. Glucocorticoid receptors. *Monogr Endocrinol.* 1979;12:49-77.

56. Rosmond R, Chagnon YC, Holm G, Chagnon M, Perusse L, Lindell K, et al. A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Obes Res.* 2000;8(3):211-8.
57. Iida S, Gomi M, Moriwaki K, Itoh Y, Hirobe K, Matsuzawa Y, et al. Primary cortisol resistance accompanied by a reduction in glucocorticoid receptors in two members of the same family. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;60(5):967-71.
58. Longui CA, Faria CD. Evaluation of glucocorticoid sensitivity and its potential clinical applicability. *Horm Res.* 2009;71(6):305-9.
59. Syed AA, Irving JA, Redfern CP, Hall AG, Unwin NC, White M, et al. Association of glucocorticoid receptor polymorphism A3669G in exon 9beta with reduced central adiposity in women. *Obesity (Silver Spring).* 2006;14(5):759-64.
60. Syed AA, Halpin CG, Irving JA, Unwin NC, White M, Bhopal RS, et al. A common intron 2 polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with insulin resistance in men. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008;68(6):879-84.
61. van den Akker EL, Koper JW, van Rossum EF, Dekker MJ, Russcher H, de Jong FH, et al. Glucocorticoid receptor gene and risk of cardiovascular disease. *Arch Intern Med.* 2008;168(1):33-9.
62. Panarelli M, Holloway CD, Fraser R, Connell JM, Ingram MC, Anderson NH, et al. Glucocorticoid receptor polymorphism, skin

- vasoconstriction, and other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(6):1846-52.
63. Huizenga NA, Koper JW, De Lange P, Pols HA, Stolk RP, Burger H, et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(1):144-51.
64. Dobson MG, Redfern CP, Unwin N, Weaver JU. The N363S polymorphism of the glucocorticoid receptor: potential contribution to central obesity in men and lack of association with other risk factors for coronary heart disease and diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(5):2270-4.
65. Koper JW, Stolk RP, de Lange P, Huizenga NA, Molijn GJ, Pols HA, et al. Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. *Hum Genet.* 1997;99(5):663-8.
66. Charmandari E, Chrousos GP, Ichijo T, Bhattacharyya N, Vottero A, Souvatzoglou E, et al. The human glucocorticoid receptor (hGR) beta isoform suppresses the transcriptional activity of hGRalpha by interfering with formation of active coactivator complexes. *Mol Endocrinol.* 2005;19(1):52-64.
67. Colli LM, do Amaral FC, Torres N, de Castro M. Interindividual glucocorticoid sensitivity in young healthy subjects: the role of glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms ratio. *Horm Metab Res.* 2007;39(6):425-9.
68. Germano CM, de Castro M, Crescencio JC, Gallo L, Jr., Antunes-Rodrigues J, Moreira AC, et al. The interaction of plasma renin activity and

- plasma atrial natriuretic peptide in 21-hydroxylase deficiency patients. *J Endocrinol Invest.* 2005;28(4):300-4.
69. Dhuper S, Cohen HW, Daniel J, Gumidyala P, Agarwalla V, St Victor R. Utility of the modified ATP III defined metabolic syndrome and severe obesity as predictors of insulin resistance in overweight children and adolescents: a cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol.* 2007;6:4.
70. Liddle GW. Clinical pharmacology of the anti-inflammatory steroids. *Clin Pharmacol Ther.* 1961;2:615-35.
71. Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Marcondes JA, Longui CA, Leite MV, et al. Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(12):4416-9.
72. 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. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006;100(4-5):161-6.
73. Roussel R, Reis AF, Dubois-Laforgue D, Bellanne-Chantelot C, Timsit J, Velho G. The N363S polymorphism in the glucocorticoid receptor gene is associated with overweight in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003;59(2):237-41.
74. Robitaille J, Brouillette C, Houde A, Despres JP, Tchernof A, Vohl MC. Molecular screening of the 11beta-HSD1 gene in men characterized by the metabolic syndrome. *Obes Res.* 2004;12(10):1570-5.

75. Falhammar H, Thoren M. Clinical outcomes in the management of congenital adrenal hyperplasia. *Endocrine*. 41(3):355-73.
76. Mooij CF, Kroese JM, Claahsen-van der Grinten HL, Tack CJ, Hermus AR. Unfavourable trends in cardiovascular and metabolic risk in paediatric and adult patients with congenital adrenal hyperplasia? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 73(2):137-46.
77. Charmandari E, Chrousos GP. Metabolic syndrome manifestations in classic congenital adrenal hyperplasia: do they predispose to atherosclerotic cardiovascular disease and secondary polycystic ovary syndrome? *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1083:37-53.
78. Schnaider-Rezek GS, Lemos-Marini SH, Baptista MT, Guerra-Junior G, Morcillo AM, Mello MP, et al. Metabolic evaluation of young women with congenital adrenal hyperplasia. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2011;55(8):646-52.
79. Merke DP, Bornstein SR, Avila NA, Chrousos GP. NIH conference. Future directions in the study and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Ann Intern Med*. 2002;136(4):320-34.
80. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev*. 2000;21(3):245-91.
81. Etxabe J, Vazquez JA. Morbidity and mortality in Cushing's disease: an epidemiological approach. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1994;40(4):479-84.

82. Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, Dumesic DA. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Human reproduction update*. 2005;11(4):357-74.
83. King JA, Wisniewski AB, Bankowski BJ, Carson KA, Zaccur HA, Migeon CJ. Long-term corticosteroid replacement and bone mineral density in adult women with classical congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(3):865-9.
84. Hagenfeldt K, Martin Ritzen E, Ringertz H, Helleday J, Carlstrom K. Bone mass and body composition of adult women with congenital virilizing 21-hydroxylase deficiency after glucocorticoid treatment since infancy. *Eur J Endocrinol*. 2000;143(5):667-71.
85. Stikkelbroeck NM, Oyen WJ, van der Wilt GJ, Hermus AR, Otten BJ. Normal bone mineral density and lean body mass, but increased fat mass, in young adult patients with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(3):1036-42.
86. Paganini C, Radetti G, Livieri C, Braga V, Migliavacca D, Adami S. Height, bone mineral density and bone markers in congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res*. 2000;54(4):164-8.
87. Helleday J, Siwers B, Ritzen EM, Carlstrom K. Subnormal androgen and elevated progesterone levels in women treated for congenital virilizing 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;76(4):933-6.
88. Gussinye M, Carrascosa A, Potau N, Enrubia M, Vicens-Calvet E, Ibanez L, et al. Bone mineral density in prepubertal and in adolescent and

- young adult patients with the salt-wasting form of congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics*. 1997;100(4):671-4.
89. Cameron FJ, Kaymakci B, Byrt EA, Ebeling PR, Warne GL, Wark JD. Bone mineral density and body composition in congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(7):2238-43.
90. 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*.7(9):e44893.
91. Moreira RP, Villares SM, Madureira G, Mendonca BB, Bachega TA. Obesity and Familial Predisposition Are Significant Determining Factors of an Adverse Metabolic Profile in Young Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia. *Horm Res Paediatr*.
92. Ness-Abramof R, Apovian CM. Waist circumference measurement in clinical practice. *Nutr Clin Pract*. 2008;23(4):397-404.
93. Nakazone MA, Pinheiro A, Braile MC, Pinhel MA, de Sousa GF, Pinheiro S, Jr., et al. [Prevalence of metabolic syndrome using NCEP-ATPIII and IDF definitions in Brazilian individuals]. *Rev Assoc Med Bras*. 2007;53(5):407-13.
94. Livingstone C, Collison M. Sex steroids and insulin resistance. *Clin Sci (Lond)*. 2002;102(2):151-66.
95. Jones TH. Effects of testosterone on Type 2 diabetes and components of the metabolic syndrome. *J Diabetes*.2(3):146-56.

96. Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med.* 1990;322(21):1483-7.
97. Fabsitz RR, Sholinsky P, Carmelli D. Genetic influences on adult weight gain and maximum body mass index in male twins. *Am J Epidemiol.* 1994;140(8):711-20.
98. Chagnon YC, Perusse L, Bouchard C. Familial aggregation of obesity, candidate genes and quantitative trait loci. *Curr Opin Lipidol.* 1997;8(4):205-11.
99. van der Sande MA, Walraven GE, Milligan PJ, Banya WA, Ceesay SM, Nyan OA, et al. Family history: an opportunity for early interventions and improved control of hypertension, obesity and diabetes. *Bull World Health Organ.* 2001;79(4):321-8.
100. 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. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(7):3141-5.
101. Ukkola O, Perusse L, Chagnon YC, Despres JP, Bouchard C. Interactions among the glucocorticoid receptor, lipoprotein lipase and adrenergic receptor genes and abdominal fat in the Quebec Family Study. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25(9):1332-9.
102. Buemann B, Vohl MC, Chagnon M, Chagnon YC, Gagnon J, Perusse L, et al. Abdominal visceral fat is associated with a BclI restriction fragment

- length polymorphism at the glucocorticoid receptor gene locus. *Obes Res.* 1997;5(3):186-92.
103. Di Blasio AM, van Rossum EF, Maestrini S, Berselli ME, Tagliaferri M, Podesta F, et al. The relation between two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and body mass index, blood pressure and cholesterol in obese patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003;59(1):68-74.
104. Watt GC, Harrap SB, Foy CJ, Holton DW, Edwards HV, Davidson HR, et al. Abnormalities of glucocorticoid metabolism and the renin-angiotensin system: a four-corners approach to the identification of genetic determinants of blood pressure. *J Hypertens.* 1992;10(5):473-82.
105. Arlt W, Krone N. Adult consequences of congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res.* 2007;68 Suppl 5:158-64.
106. De Iudicibus S, Stocco G, Martelossi S, Drigo I, Norbedo S, Lionetti P, et al. Association of Bcl1 polymorphism of the glucocorticoid receptor gene locus with response to glucocorticoids in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2007;56(9):1319-20.
107. van Rossum EF, Lamberts SW. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res.* 2004;59:333-57.

APÊNCICE

Impact of Glucocorticoid Receptor Gene Polymorphisms on the Metabolic Profile of Adult Patients with the Classical Form of 21-Hydroxylase Deficiency

Ricardo P. P. Moreira*, Larissa G. Gomes, Berenice B. Mendonca, Tânia A. S. S. Bachega

Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM/42), Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

Background: CAH patients have an increased risk of cardiovascular disease, and it remains unknown if lifelong glucocorticoid (GC) treatment is a contributing factor. In the general population, glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) polymorphisms are associated with an adverse metabolic profile. Our aim was to analyze the association between the *NR3C1* polymorphisms and the metabolic profile of CAH patients.

Methodology: Sixty-eight adult patients (34SV/34SW) with a mean age of 28.4 ± 9 years received dexamethasone (mean 0.27 ± 0.11 mg/day) to obtain normal androgen levels. SW patients also received fludrocortisone (50 µg/day). Metabolic syndrome (MetS) was defined by the NCEP ATPIII criteria and obesity by $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$. *NR3C1* alleles were genotyped, and association analyses with phenotype were carried out with Chi-square, *t*-test and regression analysis.

Results: Obesity and MetS were observed in 23.5% and 7.3% of patients, respectively, and were not correlated with GC doses and treatment duration. BMI was positively correlated with blood pressure (BP), triglycerides (TG), LDL-c levels and HOMA-IR and inversely correlated with HDL-c levels. *BclI* and A3669G variants were found in 26.4% and 9.6% of alleles, respectively. Heterozygotes for the *BclI* polymorphism presented with higher BMI ($29 \text{ kg/m}^2 \pm 5.3$ vs. $26 \text{ kg/m}^2 \pm 5.3$, respectively) and waist circumference ($89 \text{ cm} \pm 12.7$ vs. $81 \text{ cm} \pm 13$, respectively) compared to wild-type subjects. Hypertension was found in 12% of patients and heterozygotes for the *BclI* polymorphism presented higher systolic BP than wild type subjects. Low HDL-c and high TG levels were identified in 30% and 10% of patients, respectively, and were not associated with the *NR3C1* polymorphisms. A3669G carriers and non-carriers did not differ.

Conclusion: In addition to GC therapy, the *BclI* GR variant might play an important role in obesity susceptibility in CAH patients. Genotyping of GR polymorphisms could result in the identification of a subgroup at risk patients, allowing for the establishment of personalized treatment and the avoidance of long-term adverse consequences.

Citation: Moreira RPP, Gomes LG, Mendonca BB, Bachega TASS (2012) Impact of Glucocorticoid Receptor Gene Polymorphisms on the Metabolic Profile of Adult Patients with the Classical Form of 21-Hydroxylase Deficiency. PLoS ONE 7(9): e44893. doi:10.1371/journal.pone.0044893

Editor: Vincent Laudet, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France

Received March 8, 2012; **Accepted** August 14, 2012; **Published** September 18, 2012

Copyright: © 2012 Moreira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was supported by grants from FAPESP #09/54238-2, Moreira RPP by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP #09/54394-4, Bachega TASS by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq #305117/2009-2 and Mendonca BB by CNPq #301339/2008-9. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: paranhos@usp.br

Introduction

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency is a common autosomal recessive disorder that leads to decreased glucocorticoid secretion, with or without mineralocorticoid deficiency, and to increased androgen production [1]. CAH is caused by mutations in the *CYP21A2* gene, which codes for 21-hydroxylase, a key enzyme involved in cortisol and aldosterone synthesis, and accounts for 90–95% of adrenal enzymatic defects [1,2].

The spectrum of clinical manifestations depends on the degree of 21-hydroxylase impairment, including a severe form with prenatal virilization of the external genitalia in female fetuses and postnatal virilization in both sexes, with or without salt loss (classical forms), and a milder form with late onset hyperandro-

genic signs (nonclassical). The classical form of CAH has a prevalence of about one in 15,000 to one in 16,000 live births in the general population [1,2].

The introduction of glucocorticoid (GC) replacement therapy in the 1950s has allowed for a normal life span in CAH patients. Current GC therapy aims to provide adequate glucocorticoid replacement dose and to suppress the abnormal androgen secretion; mineralocorticoid replacement aims to control the renal salt balance to avoid adrenal crisis [1,2,3]. Nevertheless, these therapeutic goals are difficult to achieve in practice due to the complexity of replicating the physiologic circadian rhythm of cortisol secretion [4,5].

Recent studies have demonstrated the increased prevalence of obesity, insulin resistance and hypertension [6,7,8], as well as adverse lipid profiles, among adult and pediatric CAH patients.

These findings suggest that CAH patients are prone to developing an unfavorable cardiovascular risk profile [7]. CAH patients can also develop signs and symptoms of iatrogenic Cushing's syndrome [3], mainly due to the supraphysiological doses of GC used to suppress hyperandrogenism and chronically to reduce 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) levels. Previous studies have associated the increased prevalence of obesity and hypertension with hypercortisolism [9]; however, other factors may be involved, such as individual glucocorticoid sensitivity.

Völk et al. [10] demonstrated an important contribution of parental obesity to the increased body mass index (BMI) in children and adolescents with CAH, suggesting that genetic factors could be involved with obesity predisposition. On the other hand, none of the available studies have evaluated the role of genetic polymorphisms on the metabolic profiles of CAH patients.

In the general population, some glucocorticoid receptor (*NR3C1*) gene polymorphisms, are linked with increased BMI, blood pressure and lipid levels and, consequently, increased cardiovascular risk [11]. The *BclI* polymorphism, located at intron 2, has been associated with increased GC sensitivity and with these abovementioned clinical manifestations [11,12,13,14,15]. Another *NR3C1* polymorphism, the A3669G, is linked with increased expression and stabilization of the dominant negative splice variant GR- β , which results in relative GC resistance. Recent studies have suggested that A3669G carriers have an increased pro-inflammatory state and an increased risk for cardiovascular disease [11,16].

Considering the variability in the prevalence of obesity and metabolic syndrome (MetS) in adult CAH patients, our aim was to evaluate whether *NR3C1* polymorphisms could account for the development of this adverse metabolic profile in a series of CAH patients from same center. We observed that *BclI* allele could influence the sensitivity to glucocorticoids in CAH patients, since their carriers presented higher BMI, waist circumference and systolic blood pressure in comparison with non-carriers.

Methods

Subjects

The study was approved by the Ethical Committee of Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (0231/2010), and written consent was obtained from all the participants. The inclusion criteria were patients with the classical form of CAH, stable glucocorticoid and mineralocorticoid therapy in the last two years, no use of enzyme inductor drugs and good compliance, which was characterized by normal androgen and PRA levels in at least 3 out of 4 annual measurements.

From a cohort of 135 adult CAH patients, we selected 68 with a mean age of 28.4 ± 8.6 years, who presented regularly at our endocrine service. Thirty-four patients (24 females) had the simple virilizing (SV) form, characterized by ambiguous genitalia in girls and postnatal virilization signs in both sexes. Thirty-four patients (24 females) had the salt wasting (SW) form, and they also presented with volume depletion, sodium levels <130 mmol/liter and increased plasma renin activity (PRA). All patients presented with a basal 17-OHP >150 nmol/L and molecular diagnosis of classical CAH [17].

After reaching their final height, all individuals were treated with dexamethasone (0.27 ± 0.11 mg) once a day, doses of which are available in tablet (0.5 mg) and elixir (0.1 mg/mL) formulations. Mean daily glucocorticoid doses were calculated by body surface area (mg/m^2) and evaluated retrospectively in the last 2 years. The glucocorticoid doses were converted to hydrocortisone equivalents using anti-inflammatory equivalents (30 mg hydro-

cortisone = 0.75 mg dexamethasone). The hydrocortisone equivalents are also presented as mg/m^2 . For the salt wasters, fludrocortisone was maintained at a mean dose of 50 ± 25 mcg/day. The mean of duration of glucocorticoid therapy was 25.4 ± 9.8 years.

Hormonal Control

Treatment efficacy was assessed by hormonal control, characterized by normal androgen levels according to sex. The laboratory goals included the normalization of androstenedione and testosterone levels for females during the follicular phase of their menstrual cycle and androstenedione levels for men. The mineralocorticoid replacement was monitored by blood pressure and PRA, which was maintained in the upper half of the normal reference range [18].

PRA was measured using commercial kits (CIS-Bio International Gif-Sur-Yvette, France). Serum androstenedione levels were measured by chemiluminescence assay (Immulite 2000, Siemens Health Care, UK). Intra-assay and inter-assay coefficients of variation varied from 5% to 10%, respectively. Glucose was determined by an automatic enzymatic colorimetric method using hexokinase (Cobas Integra; Roche, Basel, Switzerland). Serum testosterone and insulin was determined by Auto Delfia fluorimmunoassay (Perkin-Elmer, Turku, Finland). Total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL-c), low-density lipoprotein (LDL-c) and triglycerides (TG) levels were analyzed by an automatic enzymatic colorimetric method (Cobas Mira; F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland).

Clinical, anthropometric and laboratory measurements

All patients underwent physical examination to obtain anthropometric measurements. Obesity was defined by a $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$ and overweight by a BMI between $25\text{--}29.9 \text{ kg}/\text{m}^2$. Waist circumference was defined as abnormal if ≥ 102 cm in men and ≥ 88 cm in women.

Metabolic syndrome was defined according to the National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III criteria (NCEP ATPIII), with abnormal values for at least 3 of the 5 criteria: waist circumference, systolic or diastolic blood pressure, fasting glucose, HDL-c and triglycerides [19].

To evaluate the metabolic profile, blood samples were taken for the measurements of glucose, insulin, TC, HDL-c, LDL-c and TG at a fasting state, before the subjects took their hormonal replacement therapy.

Elevated blood pressure was defined as values $\geq 135/85 \text{ mmHg}$. Abnormal TG levels were characterized as values $\geq 150 \text{ mg/dL}$, HDL-c $<40 \text{ mg/dL}$ in men and $<50 \text{ mg/dL}$ in women and fasting glucose $\geq 110 \text{ mg/dL}$ [19]. Insulin resistance was assessed by the homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR).

Genetic Analysis

DNA samples from the patients were obtained from peripheral blood leukocytes by salting out procedures. PCR amplification of the glucocorticoid receptor gene regions was carried out using primer sequences and amplification conditions as previously described [20,21].

The A3669G polymorphism is located in the 3' untranslated region of exon 9 β , at nucleotide position 3669 (an A to G alteration), and was genotyped by sequencing. PCR products were sequenced using the Big Dye Terminator Sequencing KitTM (Applied Biosystem, Inc., Foster City, CA, USA) and capillary electrophoresis on an ABI PRISM 3100 sequencer (Applied Biosystem, Inc.).

The ER22/23EK polymorphism comprises two linked, single nucleotide variations separated by one base pair in exon 2. The first substitution at nucleotide position 198 is silent, changing codon 22 from GAG to GAA. The second mutation changes codon 23 at nucleotide position 200 from AGG to AAG. The N363S polymorphism changes codon 363 of exon 2 at nucleotide position 1220 from AAT to AGT. Sequence traces were analyzed using Sequencher (version 4.5 build 1416).

The *BclI* polymorphism results in an intronic C to G change, 646 nucleotides downstream from exon 2. It was screened by an allele-specific PCR as previously described [21]. The results of the allele-specific PCR were confirmed by direct sequencing in 20 patients.

Statistical analysis

Comparison of genotypes frequencies between different groups of patients and sex was carried out using a χ^2 test. Normal distribution for all continuous variables was tested, and some were logarithmically transformed. At baseline, independent *t*-test for independent groups was applied to compare continuous variables. Results are reported as means \pm SD. These analyses were also performed with adjustment for age and sex by multivariable modeling.

Pearson's correlation coefficients were used to calculate correlations between BMI, GC dose, insulin, HOMA, and lipid levels after correction for age and sex. Correlation analysis was also applied to compare the mean androgen levels of the least two years of GC therapy with BMI, waist circumference, BP and metabolic profile. $P < 0.05$ was considered to indicate a significant difference.

Hardy-Weinberg equilibrium for the *BclI* and A3669G variants was calculated. Statistical analysis was performed using the software SigmaStat version 3.5 for Windows (Systat Software, Point Richmond, CA).

Results

The clinical and anthropometric data of CAH patients are described in Table 1. Allelic frequencies of *BclI* and A3669G *NR3C1* polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium. The *BclI* polymorphism was found in 26.4% of the alleles, with 6 homozygous patients and 24 heterozygous patients. The A3669G polymorphism was found in 9.6% of the alleles, in 11 heterozygous patients and only 1 homozygous patient. The N363S and ER22/23EK alleles were identified in 1 patient as heterozygous for each polymorphism. For statistical analysis, we selected only polymorphisms with a frequency $\geq 5\%$ (*BclI* and A3669G).

Obesity and metabolic syndrome prevalence in adults with CAH

Obesity was observed in 16 CAH patients (23.5% of patients), being more prevalent in the males ($n = 9$, 56%), and in similar frequencies between the SW and SV groups (50%). Overweight was observed in 23 patients (33.8% of patients), and it was more frequent in the patients with the SW form ($n = 13$, 56.5%) and in females ($n = 18$, 78.3%). Metabolic syndrome was observed in 7.3% of patients; three out of 5 patients presented with the simple virilizing form, and 3 were male.

Clinical and biochemical markers of metabolic risk

BMI was positively correlated with higher systolic and diastolic blood pressures, triglycerides, LDL-c levels and HOMA-IR values ($P < 0.01$), and it was inversely correlated with HDL-c levels ($P = 0.03$). There were no correlations among BMI, GC dose,

duration of therapy and androstenedione and testosterone levels, although the latter measurements were inversely correlated with HDL-c levels in female patients (testosterone $r = -0.45$, $P < 0.01$; androstenedione $r = -0.629$, $P < 0.01$). The remaining components of MetS were not correlated with androstenedione levels in both sexes.

As expected, the male patients presented with worse metabolic profiles compared to the females, characterized by increased WC values, higher BMI, systolic blood pressure, LDL-c and TG levels and lower HDL-c levels (Table 1). Increased TG levels (≥ 150 mg/dL) were observed in 10% of the patients ($n = 7$), with 4 out 7 patients presenting with the SV form. Low HDL-c levels were observed in 19 patients (30% of cases), with higher frequency in the SW form compared to the SV form ($n = 12$, 63%). Hypertension was identified in 8 patients (12%) and was more prevalent in the SV patients ($n = 5$, 71.4%). Increased waist circumference values were observed in 14 patients, being more prevalent in the SV patients ($n = 9$, 64%) and with similar frequencies between both sexes ($n = 7$ both, 50%).

Decreased serum HDL-c levels were the most frequent component of the metabolic syndrome (30%) identified, followed by increased waist circumference (23.5%), high blood pressure (12%) and serum triglycerides levels (10%). Fasting plasma glucose level higher than 110 mg/dL was not observed in this series. The frequencies of the metabolic syndrome components, such as increased TG levels and blood pressure, were higher in the obese patients compared to the non-obese patients (Figure 1, $P < 0.05$), independent of sex, age, GC dose, clinical form and duration of treatment.

Impact of NR3C1 polymorphisms on the metabolic profile of CAH patients

Comparison of the clinical and laboratory data between carriers and non-carriers of the *BclI* polymorphism is shown in Table 2. *BclI* carriers presented with higher BMI, waist circumference and systolic blood pressure compared to wild-type carriers in the *t*-test analysis. These results were also adjusted according to sex and age in the linear multiple analyses and remained statistically significant (Table 2). We also found that *BclI* heterozygous carriers also presented higher BMI ($29 \text{ kg/m}^2 \pm 5.3$ vs. $23.9 \text{ kg/m}^2 \pm 2.7$, $P = 0.03$), waist circumference ($89 \text{ cm} \pm 12.7$ vs. $72.8 \text{ cm} \pm 5.6$, $P = 0.005$) and TG levels ($91.3 \text{ mg/dL} \pm 45.5$ vs. $50.7 \text{ mg/dL} \pm 27.8$, $P = 0.009$) as compared to *BclI* homozygous carriers. There were no significant differences observed in the HOMA-IR value and lipid profile between carriers and non-carriers of the *BclI* polymorphism (Table 2).

The frequency of the *BclI* polymorphism was higher in the obese patients compared to the non-obese patients (62.5% vs. 38.4%, respectively), and the frequency was also higher in the patients presenting with the metabolic syndrome (80% vs. 41.3%, respectively); however, these differences were not statistically significant.

Table 3 shows the clinical and laboratorial data of A3669G and wild-type carriers, and no differences were identified in cardiovascular risk factors such as BMI, waist circumference, blood pressure, HOMA-IR and lipid profile. There was no significant difference in the frequency of the A3669G polymorphism between the obese and non-obese CAH patients, 12.5% vs. 19.2%, respectively, or between the patients with and without metabolic syndrome, 20% vs. 17.4%, respectively.

Table 1. Clinical and anthropometric characteristics of 68 adult CAH patients.

Variables	Female (N = 48)	Male (N = 20)	P value
Age, mean [SD], years	29.2 (9.5)	26.9 (6.8)	0.449
BMI, mean [SD], kg/m ²	25.7 (4.1)	29.5 (7.1)	0.035
Increased WC, n (%)	7 (14.6)	7 (35)	0.238
GC dose, mean [SD], mg/m ²	11.2 (4.5)	10.5 (3.7)	0.696
Duration of GC therapy, years	26.6 (10.6)	21.9 (7.2)	0.039
HOMA-IR index, mean [SD]	2.24 (1.02)	2.5 (1.7)	0.376
Total cholesterol, mean [SD], mg/dL	174 (35)	186.3 (33.3)	0.186
HDL-c, mean [SD], mg/dL	58.2 (13.2)	49 (12)	0.010
LDL-c, mean [SD], mg/dL	100.2 (28)	116.8 (26.9)	0.033
Triglycerides, mean [SD], mg/dL	78.4 (40.5)	102.7 (45.8)	0.014
Systolic blood pressure, mean [SD], mmHg	118.7 (18.9)	123.5 (8.3)	0.042
Diastolic blood pressure, mean [SD], mmHg	76.9 (6.7)	80.1 (6.8)	0.074

Values are given as means \pm SD. BMI: Body Mass Index; GC, glucocorticoid; WC: Waist Circumference.

doi:10.1371/journal.pone.0044893.t001

Discussion

The introduction of glucocorticoid therapy 60 years ago has allowed for a normal life span to CAH patients; however, increasing attention has been paid to the adverse long-term health effects of chronic hyperandrogenism and/or glucocorticoid therapy on the metabolic profile [7,8,22]. There is evidence of the increased prevalence of overweight/obesity in CAH patients compared to the normal population [6,7,23], and there is debate on whether long-term GC exposure or higher GC doses might be contributing factors.

In a multicenter study from the United Kingdom, a higher prevalence of obesity was observed in CAH patients (41% of patients) in comparison with the reference population. However, these patients received different regimens of glucocorticoids and suppressed 17-OHP levels (<12 nmol/L) were observed in 45% and 37% of CAH females and males, respectively [6]; thus, overtreatment could contribute to the development of obesity. Although in our series we selected patients followed in a same center and under a homogenous glucocorticoid replacement and

hormonal control, we also found a higher frequency of obesity in comparison with our reference population (25), but it was lower than the former study (7). The aim of GC substitution therapy in our series was just to normalize the androgen levels, but not 17-OHP, and therefore the mean 17-OHP levels were higher (175.2 nmol/L) than the United Kingdom series and probably the mean daily GC doses could be lower in our patients. Considering these findings, we also speculated whether GC doses and/or duration of therapy differed between the obese and non-obese CAH patients and no significant differences were observed.

According to the MetS prevalence in our cohort, it was similar to the reference population from the same region [24]. Other CAH studies presented discordant results, and thus, we could not rule out an effect of different sample sizes, GC regimes and aims in the hormonal control as well as the use of different criteria in defining cardiovascular risk factors [6,25,26]. As it occurs in the general population, several factors could be involved with cardiovascular risk in CAH patients, such as obesity, hypertension and familial and/or genetic predisposition. Many works have analyzed the role of the *BclI* and A3669G *NR3C1* polymorphisms

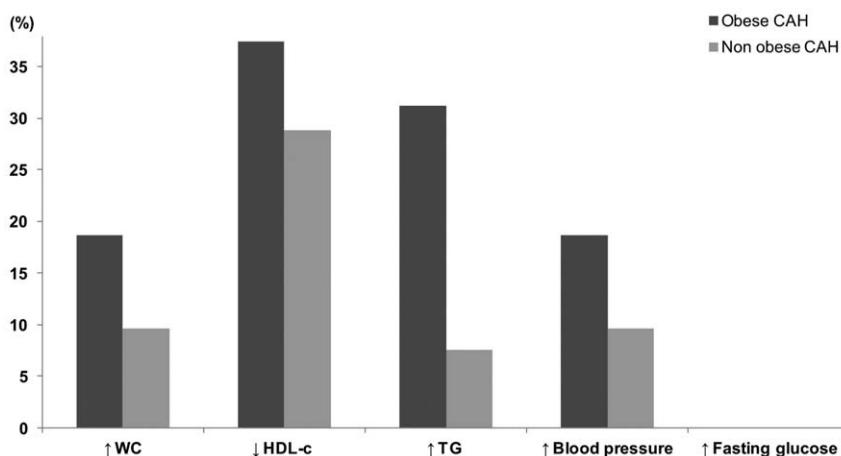


Figure 1. Comparison of frequency of metabolic syndrome components between CAH obese and CAH non-obese patients according to NCEP ATP III criteria.
doi:10.1371/journal.pone.0044893.g001

Table 2. Impact of *BclI* polymorphism on the metabolic profile of CAH patients.

Variable	Genotypes		Wild type n = 38	P value ^{a,b}	Adjusted ^b P value	Confidence ^b Interval CI 95%
	<i>BclI</i> (homozygous) n = 6	<i>BclI</i> (heterozygous) n = 24				
BMI, mean [SD], kg/m ²	23.9 (2.7)	29 (5.3)	26 (5.3)	0.018	0.044	1.00–1.24
Waist circumference, mean [SD], cm	72.8 (5.6)	89 (12.7)	81 (13)	0.011	0.044	1.00–1.09
GC dose, mean [SD], mg/m ²	11.2 (4.4)	9.9 (3.7)	11.6 (4.6)	0.137	0.164	0.78–1.04
Duration of GC therapy, mean [SD], y	22 (5.5)	25.6 (9.5)	25.4 (10.8)	0.240	0.461	0.91–1.21
HOMA-IR index	2.3 (1.5)	2.3 (1.4)	2.4 (1.2)	0.452	0.854	0.62–1.47
Serum total cholesterol, mean [SD], mg/dL	159.2 (27.2)	177 (39)	180.9 (32.8)	0.669	0.728	0.98–1.01
Serum HDL, mean [SD], mg/dL	63 (15.5)	52 (14.4)	56.5 (12.2)	0.111	0.216	0.93–1.02
Serum LDL, mean [SD], mg/dL	86 (19.6)	106.3 (30.6)	107.3 (27.8)	0.224	0.901	0.98–1.02
Serum triglycerides, mean [SD], mg/dL	50.7 (27.8)	91.3 (45.5)	87.4 (42.2)	0.009	0.828	0.99–1.01
Systolic blood pressure, mean [SD], mmHg	123 (6.7)	124.9 (7.1)	116.7 (8.9)	<0.001	0.008	1.03–1.29
Diastolic blood pressure, mean [SD], mmHg	75.3 (5.6)	80.1 (7.1)	76.8 (6.5)	0.064	0.179	0.97–1.16

Values are given as means ± SD.

Adjusted for age and sex.

^aUnivariated analysis.^bComparison between *BclI* heterozygous and wild type carriers.

BMI: Body Mass Index; GC: glucocorticoid.

doi:10.1371/journal.pone.0044893.t002

Table 3. Impact of A3669G polymorphism on the metabolic profile of CAH patients.

Variables	Genotype		P value ^a	Adjusted P value	Confidence Interval - CI 95%
	A3669G n = 12	Wild type n = 56			
BMI, mean [SD], kg/m ²	26.8 (5)	26.8 (5.5)	0.942	0.974	0.88–1.13
Waist circumference, mean [SD], cm	83.3 (12.2)	83 (13.5)	0.797	0.997	0.95–1.05
GC dose, mean [SD], mg/m ²	10.6 (5)	11.1 (4.2)	0.727	0.947	0.84–1.18
Duration of GC therapy, mean [SD], y	22.8 (12.1)	25.6 (9.4)	0.631	0.621	0.85–1.05
HOMA-IR index, mean [SD]	2.1 (0.7)	2.4 (1.4)	0.427	0.594	0.47–1.54
Serum total cholesterol, mean [SD], mg/dL	192.7 (24.4)	174.4 (35.9)	0.097	0.192	0.99–1.04
Serum HDL-c, mean [SD], mg/dL	58.8 (9.5)	54.8 (14.1)	0.346	0.370	0.97–1.08
Serum LDL-c, mean [SD], mg/dL	115.6 (28.1)	102.8 (28.3)	0.161	0.219	0.99–1.04
Serum triglycerides, mean [SD], mg/dL	88.6 (35.1)	84.9 (45.1)	0.398	0.897	0.98–1.02
Systolic blood pressure, mean [SD], mmHg	121.5 (13.2)	119.8 (7.9)	0.600	0.718	0.93–1.11
Diastolic blood pressure, mean [SD], mmHg	78.5 (8)	77.7 (6.5)	0.708	0.974	0.89–1.11

Values are given as means ± SD.

Adjusted for age and sex.

^aUnivariated analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0044893.t003

on the cardiovascular risk in the general population. The *BclI* polymorphism has been linked to increased GC sensitivity and consequently to higher BMI, waist circumference and lipid levels, compared to wild type carriers [11]; however, there are no data about the impact of these *NR3C1* polymorphisms on the metabolic profile of CAH patients.

In this study, we tested the association analysis between *NR3C1* polymorphisms and these traditional cardiovascular risk factors in patients treated exclusively with dexamethasone and similar hormonal control. Our results are consistent with previously published data from the general population, because our CAH patients carrying the *BclI* allele presented with increased BMI and waist circumference, independent of sex and age (Table 2). Additionally, the frequency of the *BclI* polymorphism was higher in the obese CAH compared to the non-obese CAH, but without statistical significance; thus, a sample size effect cannot be excluded.

The *BclI* allele has been also associated with higher blood pressure values and/or higher prevalence of hypertension [15] and similarly our CAH patients carrying this allele also presented higher systolic blood pressure levels. Probably, this result was not directly influenced by the dexamethasone therapy, considering that it has little mineralocorticoid effect [27]. Based on the data of our statistical analysis, the *BclI* allele and BMI were the major factors influencing the blood pressure values.

The fact that *BclI* heterozygous carriers presented with increased BMI, waist circumference and systolic blood pressure compared to two subgroups of homozygous carriers (mutant and wild-type) is in line with the observation in a previous study in which patients carrying the heterozygous *BclI* polymorphism gained more than twice the subcutaneous adiposity compared to homozygous subjects [28]. As hypothesized by Tremblay *et al.* [28], this phenomenon can be explained by a possible linkage disequilibrium between the *BclI* polymorphism and other polymorphisms located at regulatory regions that could influence the observed phenotype. Moreover, the compound heterozygosity could modify the GR responses to glucocorticoid, which was not observed in the homozygous carriers. This theory of the heterozygous phenotype is supported by two animal models, in which only the heterozygous and not the homozygous carriers develop the expected phenotype [29,30]. However, it is important to emphasize that few patients were homozygous for this variant in our series and a sample size effect cannot be excluded.

Additionally, our results suggest that *BclI* CAH carriers might need lower GC doses (Table 2); but probably due to sample size, this result did not reach statistical significance. Supporting this hypothesis, it was observed that, due to increased GC sensitivity associated with the *BclI* polymorphism, patients with inflammatory bowel disease carrying this variant present a better response to glucocorticoid therapy [31].

The A3669G polymorphism is associated with increased expression and stabilization of the 9 β GR isoform, and it is

correlated with glucocorticoid resistance. A recent study suggested the involvement of this polymorphism with the increased risk of cardiovascular disease in carriers compared to non-carriers. This hypothesis was supported by the findings of elevated levels of inflammatory parameters, such as IL-6 and C reactive protein, in a large cohort of elderly subjects [16]. Our CAH patients carrying the A3669G polymorphism, although they present with similar mean BMI, total cholesterol, LDL-c and triglycerides levels were higher than compared to non-carriers. However, only 12 patients carried this allele and this finding was not statistically significant (Table 3).

Besides the genetic predisposition and glucocorticoid exposure, other factors could predispose to an adverse metabolic profile in CAH patients and as expected BMI presented significant influence on HOMA-IR, lipid levels and blood pressure, which were reinforced by the finding that obese CAH patients presented with higher frequency of MetS components than the non-obese patients. Another important factor is long-term hyperandrogenic exposure, which might be an independent contributor to the development of the metabolic syndrome's components. In a cohort of untreated female patients with the simple virilizing form was observed lower insulin sensitivity and higher body weight, blood pressure, and more metabolic disorders, including higher serum TG, and lower HDL-c [22] than the controls. To exclude the effects of increased androgens levels, we selected only patients with adequate hormonal control, and interestingly, mean androgen levels over the last 2 years of therapy were inversely correlated with lower HDL-c levels in our female patients. Although these patients presented normal androgen levels, glucocorticoid therapy probably does not reproduce or allow a normal adrenal androgen secretion.

The findings of our study suggest that the *BclI* polymorphism could play an important role in the susceptibility for obesity and higher systolic blood pressure in CAH patients and the positive correlation between *BclI* polymorphisms and BMI also suggests that the different sensitivities and individual responses to glucocorticoids are at least partially genetically determined [32]. Hence, GR screening during the treatment of CAH patients could help to improve the quality of GC replacement, by identifying subgroup patients at-risk who would benefit the most from personalized treatment. In these patients, we speculate that attempts to reduce 17-OHP levels significantly could predispose them to worse metabolic consequences, and we encourage the application of preventive measures.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TASSB BBM RPPM. Performed the experiments: RPPM. Analyzed the data: RPPM TASSB. Contributed reagents/materials/analysis tools: TASSB BBM. Wrote the paper: RPPM TASSB BBM LGG. Patients recruitment follow up and genetic counseling: TASSB LGG BBM.

References

1. Speiser PW, White PC (2003) Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 349: 776–788.
2. Merke DP, Bornstein SR (2005) Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* 365: 2125–2136.
3. White PC, Speiser PW (2000) Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 21: 245–291.
4. Debono M, Ross RJ, Newell-Price J (2009) Inadequacies of glucocorticoid replacement and improvements by physiological circadian therapy. *Eur J Endocrinol* 160: 719–729.
5. Charmandari E, Chrousos GP (2006) Metabolic syndrome manifestations in classic congenital adrenal hyperplasia: do they predispose to atherosclerotic cardiovascular disease and secondary polycystic ovary syndrome? *Ann N Y Acad Sci* 1083: 37–53.
6. Arlt W, Willis DS, Wild SH, Krone N, Doherty EJ, et al. Health status of adults with congenital adrenal hyperplasia: a cohort study of 203 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 5110–5121.
7. Mooij CF, Kroes JM, Claahsen-van der Grinten HL, Tack CJ, Hermus AR Unfavourable trends in cardiovascular and metabolic risk in paediatric and adult patients with congenital adrenal hyperplasia? *Clin Endocrinol (Oxf)* 73: 137–146.
8. Reisch N, Arlt W, Krone N Health problems in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Horm Res Paediatr* 76: 73–85.

9. Etxabe J, Vazquez JA (1994) Morbidity and mortality in Cushing's disease: an epidemiological approach. *Clin Endocrinol (Oxf)* 40: 479–484.
10. Volk TM, Simm D, Beier C, Dorr HG (2006) Obesity among children and adolescents with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics* 117: e98–105.
11. Manenschijn L, van den Akker EL, Lamberts SW, van Rossum EF (2009) Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms. An overview. *Ann N Y Acad Sci* 1179: 179–198.
12. Rosmond R, Chagnon YC, Holm G, Chagnon M, Perusse L, et al. (2000) A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Obes Res* 8: 211–218.
13. Buemann B, Vohl MC, Chagnon M, Chagnon YC, Gagnon J, et al. (1997) Abdominal visceral fat is associated with a BclI restriction fragment length polymorphism at the glucocorticoid receptor gene locus. *Obes Res* 5: 186–192.
14. Syed AA, Halpin CG, Irving JA, Unwin NC, White M, et al. (2008) A common intron 2 polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with insulin resistance in men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 68: 879–884.
15. Watt GC, Harrap SB, Foy CJ, Holton DW, Edwards HV, et al. (1992) Abnormalities of glucocorticoid metabolism and the renin-angiotensin system: a four-corners approach to the identification of genetic determinants of blood pressure. *J Hypertens* 10: 473–482.
16. van den Akker EL, Koper JW, van Rossum EF, Dekker MJ, Russcher H, et al. (2008) Glucocorticoid receptor gene and risk of cardiovascular disease. *Arch Intern Med* 168: 33–39.
17. Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Marcondes JA, Longui CA, et al. (1998) Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 4416–4419.
18. Arlt W, Allolio B (2003) Adrenal insufficiency. *Lancet* 361: 1881–1893.
19. (2001) Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285: 2486–2497.
20. Karl M, Lamberts SW, Detera-Wadleigh SD, Encio IJ, Stratakis CA, et al. (1993) Familial glucocorticoid resistance caused by a splice site deletion in the human glucocorticoid receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 683–689.
21. Gergics P, Patocs A, Majnik J, Balogh K, Szappanos A, et al. (2006) Detection of the Bcl I polymorphism of the glucocorticoid receptor gene by single-tube allele-specific polymerase chain reaction. *J Steroid Biochem Mol Biol* 100: 161–166.
22. Zhang HJ, Yang J, Zhang MN, Liu CQ, Xu M, et al. Metabolic disorders in newly diagnosed young adult female patients with simple virilizing 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine* 38: 260–265.
23. Falhammar H, Filipsson H, Holmdahl G, Janson PO, Nordenskjold A, et al. (2007) Metabolic profile and body composition in adult women with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 110–116.
24. Nakazono MA, Pinheiro A, Braile MC, Pinhel MA, de Sousa GF, et al. (2007) [Prevalence of metabolic syndrome using NCEP-ATPIII and IDF definitions in Brazilian individuals]. *Rev Assoc Med Bras* 53: 407–413.
25. Falhammar H, Filipsson Nyström H, Wedell A, Thoren M Cardiovascular risk, metabolic profile, and body composition in adult males with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Eur J Endocrinol* 164: 285–293.
26. Mooij CF, Kroese JM, Sweep FC, Hermus AR, Tack CJ Adult patients with congenital adrenal hyperplasia have elevated blood pressure but otherwise a normal cardiovascular risk profile. *PLoS One* 6: e24204.
27. Arlt W, Krone N (2007) Adult consequences of congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res* 68 Suppl 5: 158–164.
28. Tremblay A, Bouchard L, Bouchard C, Despres JP, Drapeau V, et al. (2003) Long-term adiposity changes are related to a glucocorticoid receptor polymorphism in young females. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3141–3145.
29. Fain JN, Ballou LR, Bahouth SW (2001) Obesity is induced in mice heterozygous for cyclooxygenase-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 65: 199–209.
30. Stenbit AE, Tsao TS, Li J, Burcelin R, Geenen DL, et al. (1997) GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat Med* 3: 1096–1101.
31. De Iudicibus S, Stocco G, Martelossi S, Drigo I, Norbedo S, et al. (2007) Association of BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene locus with response to glucocorticoids in inflammatory bowel disease. *Gut* 56: 1319–1320.
32. van Rossum EF, Lamberts SW (2004) Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res* 59: 333–357.

Obesity and Familial Predisposition Are Significant Determining Factors of an Adverse Metabolic Profile in Young Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia

Ricardo P.P. Moreira^a Sandra M. Villares^b Guiomar Madureira^a
Berenice B. Mendonça^a Tânia A.S.S. Bachega^a

^aUnidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM/42), Disciplina de Endocrinologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo,

^bLaboratório de Nutrição Humana e Doenças Metabólicas (LIM/25), Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Key Words

Congenital adrenal hyperplasia · Obesity · Metabolic syndrome · Familial predisposition · Glucocorticoid · Young patients

Abstract

Background/Aims: Glucocorticoid (GC) therapy is known to predispose to an adverse metabolic profile. Therefore, we investigated the prevalence of obesity and metabolic syndrome (MetS) in young patients with congenital adrenal hyperplasia (CAH) and to correlate this prevalence with GC treatment and family history. **Methods:** The study population consisted of 33 young CAH patients who received cortisone acetate during their growth periods; those who were salt wasters also received fludrocortisone. Obesity was defined by a body mass index (BMI) >95th percentile and MetS by the National Cholesterol Education Program Third Adult Treatment Panel modified criteria. Each patient's familial history of MetS components was assessed. The impact of GC therapy on the metabolic profile was analyzed by comparing CAH patients with BMI z-score-matched controls. **Results:**

MetS and obesity were observed in 12.1 and 30.3% of the CAH patients, respectively, both of which were higher than in the reference population. A positive family history of MetS was found to be more prevalent in the obese patients compared with the nonobese CAH patients, and similar findings were observed for the controls. The metabolic profile did not differ between the CAH patients and matched subjects. **Conclusion:** CAH patients presented a higher prevalence of obesity and MetS, which were not correlated with the GC treatment. This study suggests that obesity and familial predisposition are significant determining factors for an adverse metabolic profile in CAH patients.

Copyright © 2013 S. Karger AG, Basel

Introduction

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency is a common autosomal recessive disorder leading to decreased glucocorticoid (GC) secretion, with or without mineralocorticoid deficiency, and increased androgen production [1]. The disease is caused

by mutations in the *CYP21A2* gene, which codes for 21-hydroxylase, a key enzyme in cortisol and aldosterone synthesis [1–3]. The spectrum of clinical manifestations is quite broad and depends on the degree of the 21-hydroxylase impairment caused by *CYP21A2* mutations. Clinical CAH manifestations range from prenatal external genitalia virilization in females and postnatal virilization in both sexes, with or without salt wasting (classical forms), to a milder form with late-onset hyperandrogenic symptoms (nonclassical form) [1]. The classical forms have a prevalence of approximately 1 in 10,000 to 1 in 16,000 live births, whereas the nonclassical form affects approximately 1 in 2,500 live births [1, 2, 4].

GC replacement therapy leads to a significant improvement in the prognosis of the classical forms of CAH. Current GC therapy aims to provide adequate GC replacement and, when necessary, mineralocorticoid replacement; this is necessary both to prevent adrenal crisis and to suppress increased androgen secretion, thus enabling the patient to attain a normal final height without any signs of hypercortisolism. During the growth period, GCs with a short half-life are preferred to avoid growth suppression [1, 5, 6]. In contrast, during adulthood, a long-acting GC is preferred for possible better compliance with long-term therapy [7].

Although CAH therapy is well established [7], a limitation that remains is the difficulty in replicating the cortisol circadian rhythm, resulting in excessive GC and/or androgen exposure. Consequently, it has been observed that adult CAH patients have higher body mass index (BMI), waist-hip ratio and blood pressure as well as lower insulin sensitivity than controls [8–12]. Taken together, these data indicate an increased cardiovascular risk in adult CAH patients, the mechanisms of which may be associated with long-term GC replacement therapy and/or chronic hyperandrogenism [13].

In the literature, limited data exist on the metabolic profile of children and adolescents with CAH. In young CAH patients, increased obesity prevalence [14], lipid levels [15, 16] and insulin resistance [17] compared with controls have been reported. However, these previous studies were inconclusive because they included patients with both the classical and nonclassical forms of CAH who were receiving a mixture of GC regimes along with different approaches for hormonal control during the course of CAH management.

In the present study, we aimed to evaluate the metabolic profile of young patients with the classical forms of 21-hydroxylase deficiency who were receiving similar GC replacement and hormonal control therapies. To evaluate

the role of obesity in the prevalence of an adverse metabolic profile, we compared the clinical and laboratory data of CAH patients with the data from matched control subjects. We also evaluated the familial history of metabolic syndrome (MetS) components in both groups (the CAH patients and control subjects).

Methods

The study was approved by the Ethical Committee of the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (0231/2010), and written consent was obtained from all patients' caretakers. The study had a cross-sectional comparative design. The inclusion criteria were patients with the classical forms of CAH, with stable GC and mineralocorticoid therapy in the last 2 years in order to maintain normal androgen levels and auxology parameters [adequate growth velocity (25th–75th percentile) and normal range of bone age in relation to chronological age], no use of enzyme induction drugs and good compliance. In addition, all the patients exclusively received short-acting GCs during the growth period.

Patients

From a cohort of 41 young CAH patients, we selected 33 children and adolescents, at a mean age of 11.9 ± 3.6 years (ranging from 6.2 to 17.8 years), who presented regularly at our endocrine service. Eleven patients (6 females) had the simple virilizing (SV) form of CAH, characterized by ambiguous genitalia at birth in girls and signs of postnatal virilization in both sexes. The mean ($\pm SD$) age at diagnosis of SV patients was 3.9 ± 1.9 years. Twenty-two patients (14 females) had the salt wasting (SW) form of CAH and presented with volume depletion, sodium <130 mmol/l and increased plasma renin activity (PRA) in the neonatal period. All patients presented with a basal 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) level >150 nmol/l and a molecular diagnosis of classical CAH.

Therapy Control

Treatment efficacy was assessed by serum androgen measurements (normal androgen levels according to the chronological age and sex in at least 3 of 4 annual measurements) during the last 2 years and normal auxological parameters. Bone age was evaluated using the Greulich-Pyle system. The relationship between the achieved final height and target height was expressed as final height SD score minus target height SD score, and this value was calculated individually for each patient. No patient presented suppressed 17-OHP levels (<15 nmol/l). Mineralocorticoid replacement was monitored by blood pressure and PRA, which was maintained within the upper normal limit [18].

Patients received cortisone acetate as replacement therapy in the growth period (mean 14.6 ± 3.9 mg/day). Thirteen of the 33 patients achieved final height, and cortisone acetate was replaced by dexamethasone (mean 0.2 ± 0.1 mg) once a day in the morning, which is available both as a tablet (0.5 mg) and elixir (0.1 mg/ml) formulation. The mean daily GC doses were calculated by body surface area (milligrams per square meter) and evaluated retrospectively for the last 2 years. The GC doses were converted

to hydrocortisone equivalents using anti-inflammatory equivalents (20 mg of hydrocortisone = 25 cortisone acetate = 0.75 dexamethasone). The hydrocortisone equivalents were also presented as milligrams per square meter. For the salt wasters, fludrocortisone was maintained at a mean dose of $50 \pm 25 \mu\text{g}/\text{day}$. The duration of GC therapy varied from 3.5 to 17.2 years (mean 10.8 ± 4.1 years).

Control Group

The control group was composed of 33 young subjects (20 females) with a mean age of 11.9 ± 3.6 years selected from the general population. Follow-up of these subjects was performed by the Ambulatory Childhood Obesity Service of the Endocrinology Department at the same institution until 2009. This group was matched to the 33 CAH patients on the basis of BMI z-score (BMI, age and sex).

Anthropometric and Laboratory Measurements

Children were classified according to the age-sex tables available from the Centers for Disease Control and Prevention. The 'obese' children had a BMI ≥ 95 th percentile; the 'overweight' children's BMI was between the 85th and 95th percentiles, and the 'healthy weight' children's BMI was between the 5th and 85th percentiles. A waist circumference >90 th percentile for age and sex was defined as 'abnormal' [19].

Blood pressure was measured with an appropriately sized cuff using a standardized automated Dynamapp on the right arm with the patient in the sitting position. The average of 3 readings was recorded for analysis. Elevated systolic or diastolic blood pressure was defined as a value above the 90th percentile for age and sex [20].

To evaluate the metabolic profile, blood samples were taken, before GC and fludrocortisone administration, using an antecubital vein catheter for measurements of glucose, insulin, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) and triglycerides (TG) at fasting. Increased TG levels were characterized as values $\geq 110 \text{ mg/dl}$. An HDL-c level $\leq 40 \text{ mg/dl}$ was considered abnormal, and a fasting glucose $\geq 100 \text{ mg/dl}$ was considered increased, according to the National Cholesterol Education Program Third Adult Treatment Panel (NCEP ATP III) modified criteria [21].

Insulin resistance was assessed by the homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR), which was calculated using the following formula: insulin resistance = insulin ($\mu\text{U/ml}$) \times glucose (mmol/l) $/22.5$.

Different definitions are applied for the diagnosis of MetS; the NCEP ATP III definition is the one most commonly used for adults, but for children and adolescents there is no standardization of the diagnostic criteria. In this study, MetS was defined according to the age-modified NCEP ATP III criteria, with abnormal values for at least 3 of the following 5 criteria: systolic or diastolic blood pressure, waist circumference, fasting glucose levels, HDL-c levels and TG levels [21].

The impact of familial history on obesity and MetS components was also evaluated. Familial history was assessed during an interview by a registered medical professional and defined as 'positive' when a person recollects having a first-degree relative (a parent, grandparent or sibling) who had ever been diagnosed with hypertension, diabetes, dyslipidemia, obesity and/or cardiovascular disease.

Biochemical and Hormonal Assays

PRA was measured using commercial kits (CIS-Bio International, Gif-Sur-Yvette, France). Serum testosterone levels were measured using an immunofluorometric assay (Auto Delfia, Wallac, Finland), androstenedione levels using a chemiluminescence assay (Immulite 2000, Siemens Health Care, UK) and 17-OHP levels using a radioimmunoassay (DSL, DiaSorin, Siemens). The intra-assay and interassay coefficients of variation ranged from 5 to 10%.

Glucose was determined using an automatic enzymatic colorimetric method using hexokinase (Cobas Integra, Roche, Basel, Switzerland), and insulin was measured using an Auto Delfia fluorimunoassay (Perkin-Elmer, Turku, Finland). The total cholesterol, HDL-c and TG levels were analyzed using an automatic enzymatic colorimetric method (Cobas Mira, F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) with commercial kits from Roche (Mannheim, Germany).

Statistical Analysis

The patient data were presented as means and standard deviations for continuous variables and as frequencies and percentages for categorical variables. Height, weight and BMI were converted to z-scores based on age and sex. A normal distribution for all continuous variables was tested, and some were logarithmically transformed. Sex was included as a dichotomous variable. For qualitative variables, comparisons were assessed using the χ^2 test or Fisher's exact test. Pearson's correlation coefficient and logistic regression analysis were performed to evaluate which factors are related to overweight. Stepwise multiple linear regression analysis was used to investigate the independent predictors of obesity in both groups of children and adolescents. A p value <0.05 was considered statistically significant.

All statistical analyses were performed using the software SigmaStat version 3.5 for Windows (Systat Software, Point Richmond, Calif., USA).

Results

Clinical and Biochemical Markers of Metabolic Risk in CAH Patients

The clinical, anthropometric and biochemical data of the 33 CAH patients are presented in table 1. Obesity was observed in 30.3% of the patients ($n = 10$), of whom 8 had the SW form of CAH and 9 were female. Furthermore, 21.2% of the patients ($n = 7$) were overweight, of whom 4 had the SW form of CAH and 4 were female. The mean ($\pm SD$) GC doses in the obese, overweight and normal-weight patients were 10.4 ± 2.6 , 11.4 ± 3.9 and $11.7 \pm 3.9 \text{ mg/m}^2/\text{day}$ ($p > 0.05$), and the mean durations of therapy were 11.1 ± 5.4 , 9.7 ± 2.9 and 11.1 ± 3.7 years ($p > 0.05$), respectively. There was no significant correlation among increased BMI, sex, clinical form, duration of therapy and GC dose ($p > 0.05$).

MetS was observed in 12.1% of the patients (4 with SW CAH, 2 females). BMI was positively correlated with sys-

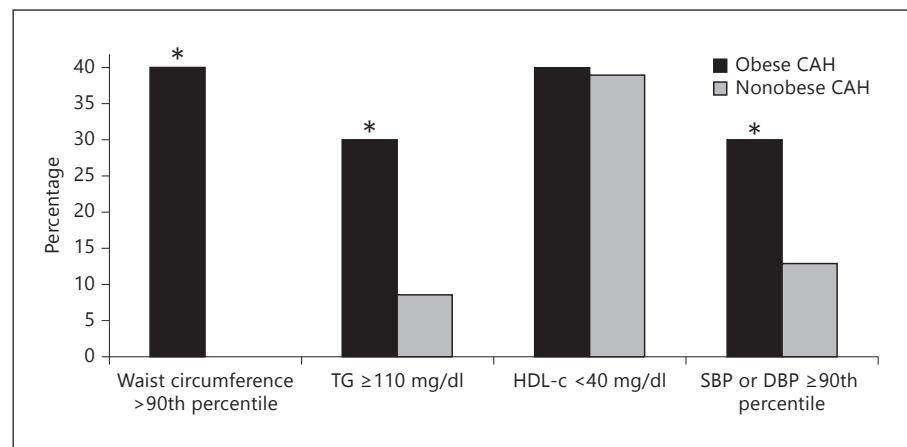


Fig. 1. Frequency of MetS components in obese and nonobese CAH patients. * $p < 0.05$. SBP = Systolic blood pressure; DBP = diastolic blood pressure.

Table 1. Clinical and anthropometric characteristics of young CAH patients

	Girls (n = 20)	Boys (n = 13)	p value
Age, years	12.3±3.7	11.2±3.4	0.416
BMI z-score	0.96±1.1	0.67±0.86	0.439
Waist circumference, cm	68.9±9.7	66.9±8.9	0.567
Fasting plasma glucose, mg/dl	82.7±7.7	80.5±7.1	0.425
Fasting insulin, μ U/ml	15.7±10	10.1±5.0	0.07
HOMA-IR	3.3±2.2	2.0±1.0	0.06
Serum total cholesterol, mg/dl	156.8±38.5	148±26.3	0.475
Serum HDL-c, mg/dl	48.9±16.4	43.3±12.7	0.308
Serum LDL-c, mg/dl	93.4±33.6	93.2±23.4	0.984
Serum TG, mg/dl	72.4±36.4	58.2±22.2	0.329
Blood pressure >90th percentile, n (%)	3 (15)	3 (23)	0.557

Values are given as means ± SD or numbers.

tolic blood pressure and HOMA-IR, total cholesterol, TG and LDL-c levels ($p < 0.01$). These correlations were independent of sex, clinical form, duration of therapy, GC dose and type of GC.

The frequencies of MetS components were higher in the obese CAH patients than in the nonobese CAH patients (fig. 1). The obese CAH patients exhibited a tendency towards hypercholesterolemia with low HDL-c levels and increased TG levels compared with the nonobese CAH patients.

Interestingly, the SW patients presented a worse lipid profile in comparison with the SV patients, characterized by increased LDL-c and TG levels and low HDL-c levels, independent of BMI, duration of treatment, GC

Table 2. Comparison of the clinical and anthropometric profile between SW and SV forms of CAH

	SW (n = 20)	SV (n = 13)	p value
Age, years	11.5±3.8	12.5±3.2	0.476
BMI z-score	0.88±1.1	0.77±0.8	0.765
Waist circumference, cm	67.2±10.3	70.1±7	0.403
Fasting plasma glucose, mg/dl	81.5±7.8	82.5±7.1	0.711
Fasting insulin, μ U/ml	12.3±6.7	16±12	0.390
HOMA-IR	2.5±1.5	3.3±2.6	0.380
Serum total cholesterol, mg/dl	162±34	135±26	0.03
Serum HDL-c, mg/dl	44.3±13.3	51.4±18.1	0.276
Serum LDL-c, mg/dl	102.9±31.2	74.4±12.9	0.005
Serum TG, mg/dl	75.6±34.1	49.2±17.9	0.006
Blood pressure >90th percentile, n (%)	2 (18.2)	2 (18.2)	1.00

Values are given as means ± SD or numbers.

dose and GC type. HOMA-IR did not differ between the SW and SV forms (table 2). The mean GC doses did not differ between the SW and SV patients (11 ± 2.5 and $11.6 \pm 4.4 \text{ mg/m}^2/\text{day}$, respectively; $p > 0.05$). We also did not observe any correlation between blood pressure values and fludrocortisone doses among the SW patients.

At the time of this analysis, 13 patients had achieved their adult final height, and they were receiving dexamethasone treatment, with a mean duration of therapy of 2.6 ± 1.7 years. Regression analysis did not show differences in the clinical and metabolic profiles between patients receiving cortisone acetate and dexamethasone, even after adjustments for sex, clinical form and duration of therapy.

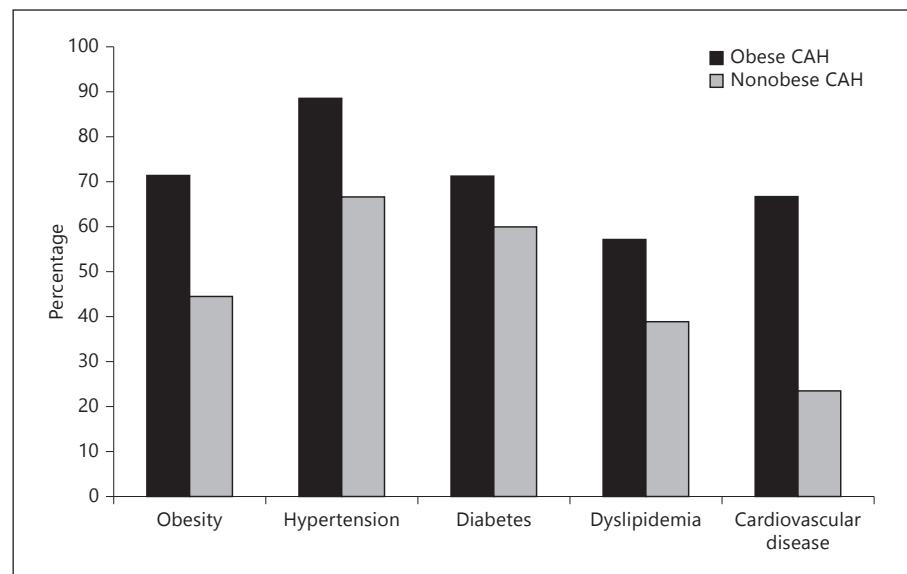


Fig. 2. Familial history of MetS components in obese and nonobese CAH patients.

Comparison between the Metabolic Profiles of CAH Patients and Matched Controls

The frequency of MetS among the CAH patients and matched controls was similar (12.1% for both). The frequencies of MetS components were compared between the patients and normal subjects. Low HDL-c levels were more prevalent in CAH patients than in control subjects (45.4 vs. 15.1%, respectively). On the other hand, increased waist circumference was more prevalent in the control subjects than in the CAH patients (21.2 vs. 12.1%, respectively). In addition, more control subjects presented increased TG levels (18.2 vs. 15.1%), blood pressure (24.2 vs. 18.2%) and fasting plasma glucose (6.0 vs. 3.0%) compared with the CAH patients. Table 3 describes the MetS components in each group.

Similar to what was observed in the CAH patients, the frequencies of MetS components were higher in the obese patients than in the nonobese control subjects.

The Role of Familial History of MetS Components in the CAH Patients and Controls

A positive familial history of hypertension was reported in 73.3% of the CAH patients, and the prevalences of diabetes, obesity, dyslipidemia and ischemic cardiovascular disease in those patients were 63, 52, 44 and 35%, respectively. The frequency of a positive familial history of obesity, dyslipidemia and ischemic cardiovascular disease differed between the obese CAH patients and nonobese CAH patients, as follows: obesity, 71 versus 44%; dyslipidemia, 57 versus 39%; diabetes, 71 versus 60%; hy-

Table 3. Comparison of clinical and anthropometric characteristics between CAH patients and matched controls

	CAH patients (n = 33)	Matched controls (n = 33)	p value
Age, years	11.8±3.6	10.7±1.8	0.145
Waist circumference, cm	68.1±9.3	72.3±10.1	0.088
Fasting plasma glucose, mg/dl	81.8±7.5	85.7±7.8	<0.044
Fasting insulin, µU/ml	13.5±8.8	7.75±6.02	<0.001
HOMA-IR	2.77±1.93	1.54±1.29	<0.001
Serum total cholesterol, mg/dl	153.4±34.1	156.2±30.6	0.728
Serum HDL-c, mg/dl	46.7±15.2	52.9±14.2	0.087
Serum LDL-c, mg/dl	93.4±29.6	87.1±28.8	0.384
Serum TG, mg/dl	66.8±31.9	78.9±35.1	0.07
Blood pressure >90th percentile, n (%)	6 (18)	7 (21)	0.199

Values are given as means ± SD or numbers.

pertension, 89 versus 67%, and cardiovascular disease, 67 versus 23%, respectively (fig. 2).

Among the matched control subjects, a positive familial history of hypertension was reported in 72.7% of the subjects, and the prevalences of obesity, cardiovascular disease, diabetes and dyslipidemia were 48.5, 48.5, 45.4 and 45.4%, respectively. In line with the CAH patient data, the obese control subjects presented an increased frequency of positive familial history for MetS components as compared with the nonobese control subjects, as

follows: obesity, 70 versus 48.5%; dyslipidemia, 70 versus 45.4%; hypertension, 80 versus 72.7%; cardiovascular disease, 48.5 versus 20%, and diabetes, 50 versus 45.4%, respectively.

Discussion

The rising prevalence of obesity and MetS has received increased attention because both conditions are important factors in the development of cardiovascular disease. Several studies have revealed unfavorable trends in the cardiovascular status and metabolic risk of adults with CAH [11, 15, 22–24]; however, the data on children and adolescents with CAH are limited.

Besides hypercortisolism, hyperandrogenism is also correlated with the development of obesity [25]; high frequencies of obesity and MetS components were observed in a cohort of late diagnosed SV CAH patients [13]. In order to identify and apply preventive measures at an early stage, we studied the prevalence of MetS components in a sample of young CAH patients from southeastern Brazil. Considering the above-mentioned data, we selected only patients with adequate hormonal control, and we excluded patients with suppressed 17-OHP levels and increased androgen levels.

In this study, we observed that 12.1% of the CAH patients and matched control subjects had MetS, and this prevalence was 80% in the obese groups. Despite our inclusion criteria, our CAH patients had a higher prevalence of obesity and overweight compared with the reference population [26], which is similar to two previous studies of CAH [14, 27]. Similar to what was observed in the general population, in our series of CAH patients and controls, BMI and waist-hip ratio were positively correlated with blood pressure, an adverse lipid profile and insulin resistance. Curiously, the matched controls presented a higher waist circumference when compared to CAH patients, but this result was not statistically significant.

The BMI z-score of our CAH group was not associated with the duration of therapy and GC dose, which is contrary to the findings of Volkl et al. [14], who found a positive correlation between GC dose and BMI in patients receiving GCs with different half-lives [14]. However, these discordant results could also be related to the different approaches to hormonal control; in the latter study, the serum 17-OHP levels were maintained at <30 nmol/l, and in our cohort, we maintained normal androgen levels according to age and sex [28]. Comparable findings were identified in our previous study involving adult CAH pa-

tients, in which there was no correlation among BMI, GC dose and duration of therapy [29].

Insulin resistance has been implicated in the pathogenesis of obesity and MetS in the general population [21]. In accordance with previous data [15, 17, 24], our patients had higher fasting serum insulin and HOMA-IR, which were not correlated with the duration of treatment or GC dose. It is likely that chronic GC exposure in genetically susceptible patients could contribute to hyperinsulinism and insulin resistance, which in turn will promote dyslipidemia and endothelial dysfunction, which are known to determine and enhance cardiovascular disease [30, 31].

A previous study demonstrated a poor lipid profile in 14 prepubertal CAH children receiving a long-acting GC, prednisone [7]. However, in another study, a favorable lipid profile, compared with that of control subjects, was found in a group of 37 children with either the classical or nonclassical form of CAH who were receiving hydrocortisone or prednisolone [32]. In our cohort, we identified a high frequency of altered lipid profiles in the CAH patients, but 30.3% of them were obese. Similar to the CAH patients, our obese control subjects had a higher frequency of dyslipidemia than the normal-weight subjects; these data suggest a role of obesity in the adverse long-term outcome of CAH.

Young CAH patients present a risk of developing high blood pressure [22, 23]. In our study, the prevalence of hypertension in 6- to 9-year-old and 9- to 18-year-old patients was 20 and 17.4% higher, respectively, than that in the reference population from the same region [33]; no difference was observed between SV and SW forms.

Surprisingly, we observed that the SW patients presented a poor clinical and metabolic profile compared to the SV patients, independent of sex and age (table 2). These results could be related to an earlier treatment onset in the SW patients as compared with the SV patients. There is a tendency to overtreat SW patients in the first year of life to avoid salt loss. Furthermore, we cannot rule out an effect of higher testosterone levels during fetal development, since animal experiments demonstrated that prenatal androgen exposure may disturb the insulin-glucose homeostasis and increase adiposity [34, 35].

Different types of GCs for replacement therapy were observed in our study. We did not notice any differences in the metabolic profile of the CAH patients receiving dexamethasone compared with those receiving cortisone acetate.

Besides the chronic GC exposure, the cause of increased obesity prevalence in young CAH patients re-

mains unclear. A Western lifestyle has been the major factor in the development of a global obesity epidemic. In addition to a relationship between environmental factors and obesity prevalence, familial history and genetic predisposition have been regarded as important factors [36, 37], but they have not been evaluated in CAH patients. The findings from our control group emphasize the importance of familial predisposition, as we identified a higher frequency of familial history of MetS components in the obese CAH group than in the nonobese CAH group; nevertheless, it is known that heritability is a contributive factor in 25–40% of obese subjects [38].

There are scarce data in the literature about metabolic profile in young CAH patients. Despite our limited sample size, our CAH group was homogeneous with regard to treatment, since they were treated in the same center, by the same physician and with the same hormonal control therapy. Our results of multiple regression analysis disclosed that the metabolic profile was not influenced by duration of treatment, age, sex or clinical form.

It is important to note that our study has some limitations, besides the limited sample size. These Brazilian subjects came from a mixed population; thus, our findings should be cautiously used to draw generalizations applicable to other populations. Moreover, the information on personal and family history was gathered through a questionnaire and was not confirmed clinically or with

laboratory tests. Further investigations are needed to accurately determine the factors that are involved in the development of MetS and obesity in CAH patients.

In conclusion, we observed a high prevalence of obesity in our cohort of young CAH patients, despite the achievement of good hormonal control. The prevalence of MetS components in the CAH patients was not associated with the GC dose or the duration of therapy, suggesting that genetic factors could be involved. We observed that familial predisposition played an important role as a risk factor in the development of MetS.

The high prevalence of MetS components in the CAH patients as well as in the control group is disturbing, and early detection of these prominent markers should prompt a thorough metabolic evaluation. A multidisciplinary team is required for CAH treatment in order to detect the above-mentioned factors and to encourage lifestyle changes that can help prevent obesity, type 2 diabetes and future cardiovascular disease.

Acknowledgments

This research was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) (09/54238-2; 09/54394-4 to R.P.P. Moreira) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (308318/2012-9 to T.A.S.S. Bachega and 305743/2011-2 to B.B. Mendonça).

References

- 1 Speiser PW, White PC: Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 2003;349:776–788.
- 2 Merke DP, Bornstein SR: Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* 2005;365:2125–2136.
- 3 Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Marcondes JA, Longui CA, Leite MV, Arnold IJ, Mendonça BB: Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83: 4416–4419.
- 4 Silveira EL, Elnecave RH, dos Santos EP, Moura V, Pinto EM, van der Linden Nader I, Mendonça BB, Bachega TA: Molecular analysis of CYP21A2 can optimize the follow-up of positive results in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Clin Genet* 2009; 76:503–510.
- 5 Gasparini N, Di Maio S, Salerno M, Argenziano A, Franzese A, Tenore A: Growth pattern during the first 36 months of life in congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *Horm Res* 1997;47:17–22.
- 6 Moreira RP, Jorge AA, Gomes LG, Kaupert LC, Massud Filho J, Mendonça BB, Bachega TA: Pharmacogenetics of glucocorticoid replacement could optimize the treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Clinics (Sao Paulo)* 2011;66:1361–1366.
- 7 Joint LWPES/ESPE CAH Working Group: Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4048–4053.
- 8 Hagenfeldt K, Martin Ritzen E, Ringertz H, Helleday J, Carlstrom K: Bone mass and body composition of adult women with congenital virilizing 21-hydroxylase deficiency after glucocorticoid treatment since infancy. *Eur J Endocrinol* 2000;143:667–671.
- 9 Stikkelbroeck NM, Oyen WJ, van der Wilt GJ, Hermus AR, Otten BJ: Normal bone mineral density and lean body mass, but increased fat mass, in young adult patients with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1036–1042.
- 10 Falhammar H, Filipsson H, Holmdahl G, Jansson PO, Nordenskjold A, Hagenfeldt K, Thoren M: Metabolic profile and body composition in adult women with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:110–116.
- 11 Arlt W, Willis DS, Wild SH, Krone N, Doherty EJ, Hahner S, Han TS, Carroll PV, Conway GS, Rees DA, Stimson RH, Walker BR, Connell JM, Ross RJ: Health status of adults with congenital adrenal hyperplasia: a cohort study of 203 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:5110–5121.
- 12 Falhammar H, Filipsson Nyström H, Wedell A, Thoren M: Cardiovascular risk, metabolic profile, and body composition in adult males with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Eur J Endocrinol* 2011;164:285–293.
- 13 Zhang HJ, Yang J, Zhang MN, Liu CQ, Xu M, Li XJ, Yang SY, Li XY: Metabolic disorders in newly diagnosed young adult female patients with simple virilizing 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine* 2010;38:260–265.

- 14 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:e98–e105.
- 15 Zimmermann A, Grigorescu-Sido P, AlKhzouz C, Patberg K, Bucerzan S, Schulze E, Zimmermann T, Rossmann H, Geiss HC, Lackner KJ, Weber MM: Alterations in lipid and carbohydrate metabolism in patients with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Horm Res Paediatr* 2010;74: 41–49.
- 16 Botero D, Arango A, Danon M, Lifshitz F: Lipid profile in congenital adrenal hyperplasia. *Metabolism* 2000;49:790–793.
- 17 Charmandari E, Weise M, Bornstein SR, Eisenhofer G, Keil MF, Chrousos GP, Merke DP: Children with classic congenital adrenal hyperplasia have elevated serum leptin concentrations and insulin resistance: potential clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2114–2120.
- 18 Auchus RJ: Congenital adrenal hyperplasia in adults. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010;17:210–216.
- 19 Fernandez JR, Redden DT, Pietrobelli A, Allison DB: Waist circumference percentiles in nationally representative samples of African-American, European-American, and Mexican-American children and adolescents. *J Pediatr* 2004;145:439–444.
- 20 Update on the 1987 Task Force Report on High Blood Pressure in Children and Adolescents: a working group report from the National High Blood Pressure Education Program. National High Blood Pressure Education Program Working Group on Hypertension Control in Children and Adolescents. *Pediatrics* 1996;98:649–658.
- 21 Dhuper S, Cohen HW, Daniel J, Gumidyala P, Agarwalla V, St Victor R: Utility of the modified ATP III defined metabolic syndrome and severe obesity as predictors of insulin resistance in overweight children and adolescents: a cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol* 2007;6:4.
- 22 Mooij CF, Kroese JM, Claahsen-van der Grinten HL, Tack CJ, Hermus AR: Unfavourable trends in cardiovascular and metabolic risk in paediatric and adult patients with congenital adrenal hyperplasia? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010;73:137–146.
- 23 Reisch N, Arlt W, Krone N: Health problems in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Horm Res Paediatr* 2011;76:73–85.
- 24 Sartorato P, Julian E, Benedini S, Mariniello B, Schiavi F, Bilora F, Pozzan G, Greggio N, Pagnan A, Mantero F, Scaroni C: 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. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92: 1015–1018.
- 25 Peeke PM, Chrousos GP: Hypercortisolism and obesity. *Ann NY Acad Sci* 1995;771:665–676.
- 26 Costa RF, Cintra Ide P, Fisberg M: Prevalence of overweight and obesity in school children of Santos city, Brazil (in Portuguese). *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006;50:60–67.
- 27 Corneau RE, Hindmarsh PC, Brook CG: Obesity in 21-hydroxylase deficient patients. *Arch Dis Child* 1998;78:261–263.
- 28 Pasquali R: Obesity and androgens: facts and perspectives. *Fertil Steril* 2006;85:1319–1340.
- 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:e44893.
- 30 Wajchenberg BL: Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000;21:697–738.
- 31 Fernandez-Real JM, Ricart W: Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 2003;24:278–301.
- 32 Williams RM, Deeb A, Ong KK, Bich W, Murgatroyd PR, Hughes IA, Acerini CL: Insulin sensitivity and body composition in children with classical and nonclassical congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010;72:155–160.
- 33 Seki M, Matsuo T, Carrilho AJ: Prevalence of metabolic syndrome and associated risk factors in Brazilian schoolchildren. *Public Health Nutr* 2009;12:947–952.
- 34 Eisner JR, Dumesic DA, Kemnitz JW, Abbott DH: Timing of prenatal androgen excess determines differential impairment in insulin secretion and action in adult female rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85: 1206–1210.
- 35 Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, Dumesic DA: Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod Update* 2005;11:357–374.
- 36 Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Hebebrand J, Martinez JA: Genes, lifestyles and obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28(suppl 3): S29–S36.
- 37 van der Sande MA, Walraven GE, Milligan PJ, Banya WA, Ceesay SM, Nyan OA, McAdam KP: Family history: an opportunity for early interventions and improved control of hypertension, obesity and diabetes. *Bull World Health Organ* 2001;79:321–328.
- 38 Snyder EE, Walts B, Perusse L, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Rankinen T, Bouchard C: The human obesity gene map: the 2003 update. *Obes Res* 2004;12:369–439.