

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

ARIANE DELAI

**Avaliação do perfil cardiometabólico na forma não clássica da
Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da 21-hidroxilase**

Ribeirão Preto – SP

2021

ARIANE DELAI

**Avaliação do perfil cardiometabólico na forma não clássica da
Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da 21-hidroxilase**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
de título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Médica

Orientadora: Profa. Dra. Livia Mara
Mermejo.

Coorientador: Prof. Dr. Ayrton Custódio
Moreira.

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Preparada pela Biblioteca do Serviço de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

Delai, Ariane

Avaliação do perfil cardiometabólico na forma não clássica da Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da 21 hidroxilase. Ribeirão Preto, 2021.

143 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientadora: Mermejo, Livia Mara.

Co-orientador: Moreira, Ayrton Custódio.

1. Hiperplasia suprarrenal congênita. 2. Fatores de risco cardiometabólico. 3. *Clamping* euglicêmico. 4. Resistência à insulina. 5. Genótipo.

DELAI, A. Avaliação do perfil cardiometabólico na forma não clássica da Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da 21-hidroxiase. 2021. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Médica

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Livia Mara Mermejo, por ser esta grande inspiração profissional e pessoal, pelo apoio incansável, confiança e ensinamentos que tanto contribuíram para meu crescimento científico e intelectual.

Ao Prof. Dr. Ayrton Custódio Moreira por compartilhar seu conhecimento e exemplo, engrandecendo o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos Professores Doutores Jorge Elias Junior e Patrícia Moreira Gomes pela colaboração e valiosas contribuições ao estudo.

À amiga e parceira Pryscilla Moreira de Souza Domingues Haj pelo companheirismo nas viagens a Ribeirão Preto e pela ajuda na coleta de dados.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) Ribeirão Preto que, direta ou indiretamente, contribuíram para que as atividades do curso de doutorado fossem realizadas.

Ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da USP Ribeirão Preto pela oportunidade de realização do curso de doutorado direto.

Aos participantes que contribuíram com seu consentimento para a realização do presente trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro à pesquisa conforme Processo 2018/10789-4.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

DELAI, A. **Avaliação do perfil cardiometabólico na Forma não clássica da Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da 21-hidroxilase.** 2021. 143 f. Tese (Doutorado Direto em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Introdução: a Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da 21-hidroxilase (HAC-21OH) é o mais frequente defeito enzimático adrenal. Nas últimas décadas, estudos demonstram maior prevalência de fatores de risco cardiovascular nesta população. **Objetivo:** avaliar um grupo de portadores da forma não clássica da Hiperplasia Adrenal Congênita (NC-HAC) por deficiência da 21-hidroxilase quanto a manifestações da doença, presença de fatores de risco cardiometabólico e sensibilidade à insulina por *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico (CEH). **Métodos:** trata-se de uma pesquisa observacional de corte transversal em 30 portadores da NC-HAC e 33 controles sadios pareados para sexo, idade e índice de massa corporal (IMC). Os pacientes foram divididos de acordo com o genótipo da doença em: mutação branda combinada a uma grave ou intermediária (genótipo C/NC) ou duas mutações brandas (genótipo NC/NC), e comparados aos controles. **Resultados:** ao diagnóstico, pacientes com genótipo C/NC apresentaram maiores níveis de 17OH progesterona basais e após estímulo de ACTH e menor idade de pubarca em comparação ao genótipo NC/NC. Todos os pacientes utilizaram glicocorticoides (tempo médio de 73 meses). O grupo de pacientes com NC-HAC apresentou maior relação cintura-quadril e menor adiponectina; crianças e adolescentes apresentaram pressão arterial elevada e hipertensão em comparação aos controles. Dos 22 pacientes submetidos ao *clamp*, 13 estavam em uso de glicocorticoide: três estavam usando acetato de cortisona, nove dexametasona e um prednisona (dose média 5,5 mg/m²/dia em equivalente de hidrocortisona). Os pacientes com NC-HAC apresentaram menor sensibilidade à insulina (M/mm 31,3 ± 20,2 vs. 56,8 ± 25,4 μmol.min⁻¹.kg⁻¹, p=0,0004), sem diferença entre os genótipos, e os valores de M/mm foram inversamente correlacionados com a duração do tratamento com glicocorticoides (r=-0,44, p=0,04). Houve associação da resistência à insulina com glicocorticoide de longa duração, mas não com os níveis de androgênios. **Conclusão:** utilizando-se o *clamp* CEH, método padrão ouro de avaliação da sensibilidade à insulina, a resistência à insulina foi demonstrada em pacientes com NC-HAC associada ao uso prolongado de glicocorticoides e glicocorticoide de longa ação, como a dexametasona, independentemente do genótipo C/NC ou NC/NC. A resistência à insulina associada a aumento da relação cintura-quadril, maiores níveis pressóricos em crianças e adolescentes e menor adiponectina demonstra a necessidade de acompanhamento regular do maior risco cardiometabólico encontrado nesses pacientes.

Palavras-chave: Hiperplasia Suprarrenal Congênita. Fatores de Risco Cardiometabólico. *Clamping* Euglicêmico. Resistência à insulina. Genótipo.

ABSTRACT

DELAI, A. **Cardiometabolic profile evaluation in the non-classic form of Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency.** 2021. 143 f. Tese (Doutorado Direto em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021

Introduction: Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase (CAH-21OH) deficiency is the most common adrenal enzymatic defect. Some studies from the last decade show increased prevalence of cardiovascular risk factors in this population. **Objective:** Evaluation of clinical presentation, cardiometabolic risk factors and insulin sensitivity evaluation by hyperinsulinemic-euglycaemic clamp in a group of patients with non-classical Congenital Adrenal Hyperplasia (NC-CAH) due to 21-hydroxylase deficiency. **Design and Setting:** Cross-sectional study with 30 University Hospital outpatient clinics and 33 controls, paired by sex, age and body mass index (BMI). Patients were subdivided into C/NC (compound heterozygous for one classical and one non-classical allele) and NC/NC (two non-classical alleles) genotypes and compared to controls. **Results:** At diagnosis, C/NC patients presented higher basal and ACTH-stimulated 17OH progesterone levels and earlier pubarche than NC/NC genotype. All patients had used glucocorticoid therapy (mean time of 73 months). The NC-CAH group showed higher waist-to-hip ratio, lower adiponectin and children and teenagers showed higher blood pressure compared to controls. Among the twenty-two patients with successful clamp, thirteen were still receiving glucocorticoid - three patients using cortisone acetate, nine dexamethasone, and one prednisone (hydrocortisone equivalent dose of 5.5 mg/m²/day). The NC-CAH patients presented lower M_{ffm} than controls (31,3 ± 20,2 vs. 56,8 ± 25,4 μmol.min⁻¹.kg⁻¹, p=0,0004), with no difference between different genotypes. The M_{ffm} values were inversely correlated with the duration of glucocorticoid treatment (r=-0.44, p=0.04). There was association of insulin resistance and long-acting glucocorticoid type but not with androgen levels. **Conclusion:** Using the gold standard method, the hyperinsulinemic-euglycemic clamp, we originally confirmed that NC-CAH patients, independently of the C/NC and NC/NC genotypes, presented insulin resistance that was associated with long-term glucocorticoid use. In addition, insulin resistance was also associated with long-action glucocorticoid such as dexamethasone. Thus, the finding of insulin resistance in addition to other evident metabolic risk components such as higher waist-to-hip ratio, low adiponectin and higher blood pressure in children and teenagers clearly demonstrate the need for a close patient follow up to avoid the increased cardiometabolic risks presented in this disease.

Keywords: Congenital Adrenal Hyperplasia. Cardiometabolic Risk Factors. *Clamp*, Euglycemic. Insulin resistance. Genotype.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Esteroidogênese do córtex adrenal..... | 14 |
| Figura 2 – Região cromossômica contendo o gene <i>CYP21</i> | 20 |
| Figura 3 – Fluxograma dos participantes selecionados..... | 39 |
| Figura 4 – Avaliação da sensibilidade tecidual à insulina obtida durante <i>clamp</i> euglicêmico-hiperinsulinêmico entre pacientes e controles..... | 56 |
| Figura 5 – Avaliação da sensibilidade tecidual à insulina obtida durante <i>clamp</i> euglicêmico-hiperinsulinêmico entre pacientes com genótipo NC/NC, C/NC e controles..... | 57 |
| Figura 6 – Avaliação da sensibilidade tecidual à insulina obtida durante <i>clamp</i> euglicêmico-hiperinsulinêmico entre pacientes em uso de glicocorticoide, sem glicocorticoide e controles..... | 58 |
| Figura 7 – Avaliação da sensibilidade tecidual à insulina obtida durante <i>clamp</i> euglicêmico-hiperinsulinêmico entre pacientes usando dexametasona vs acetato de cortisona..... | 59 |
| Figura 8 – Correlação da sensibilidade tecidual à insulina obtida durante <i>clamp</i> euglicêmico-hiperinsulinêmico e tempo de uso de glicocorticoides..... | 60 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Manifestações clínicas, genótipo e tratamento dos pacientes portadores da forma não clássica de HAC 21OH..... | 48 |
| Tabela 2 – Características dos pacientes portadores da forma não clássica de HAC 21OH separados por genótipo..... | 50 |
| Tabela 3 – Manifestações clínicas pré-puberais dos pacientes portadores da forma não clássica de HAC 21OH, separados por genótipo..... | 51 |
| Tabela 4 – Manifestações clínicas dos pacientes portadores da forma não clássica de HAC 21OH com diagnóstico pós-puberal, separados por genótipo. | 51 |
| Tabela 5 – Dados laboratoriais dos pacientes portadores da forma não clássica de HAC 21OH ao diagnóstico, separados por genótipo e por idade de diagnóstico (pré ou pós-puberal) | 52 |
| Tabela 6 – Características clínicas e antropométricas dos participantes adultos..... | 53 |
| Tabela 7 – Características clínicas e antropométricas dos participantes crianças e adolescentes..... | 54 |
| Tabela 8 – Avaliação laboratorial, composição corporal por DXA e espessura da camada mediointimal das carótidas..... | 55 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|-----------------|--|
| 17OHP | 17-Hidroxiprogesterona |
| 21OH | 21-Hidroxilase |
| ACTH | Hormônio adrenocorticotrófico |
| ASO-PCR | Reação da polimerase em cadeia alelo específica |
| C/NC | Mutação clássica/não clássica |
| <i>C4A</i> | Gene codificador do complemento C4 |
| <i>C4B</i> | Gene codificador do complemento C4 |
| CEH | <i>Clamp</i> euglicêmico hiperinsulinêmico |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| CMI | Camada Mediointimal |
| CRH | Hormônio liberador de corticotrofina |
| CT | Colesterol total |
| <i>CYP21A1P</i> | Pseudogene homólogo ao <i>CYP21A2</i> |
| <i>CYP21A2</i> | Gene codificador da enzima 21-hidroxilase |
| DHEAS | Sulfato de dehidroepiandrosterona |
| DXA | Composição corporal por dupla emissão de raio-X |
| Faepa | Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência |
| Fapesp | Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo |
| GIR | Do inglês, <i>Glucose Infusion Rate</i> |
| HAC | Hiperplasia adrenal congênita |
| HAC-21OH | HAC por deficiência de 21-hidroxilase |
| HbA1C | Hemoglobina glicada |
| HC-FMRP-USP | Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo |
| HDL | HDL-colesterol |
| HOMA-IR | <i>Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance Index</i> |
| IL-6 | Interleucina-6 |
| IMC | Índice de massa corpórea |
| LC-MS/MS | Espectrometria de Massa por Cromatografia em Fase Líquida (do inglês, <i>Liquid chromatography–mass spectrometry</i>) |
| LDL | LDL-colesterol |
| MG | Massa Gorda |

| | |
|-------------|---|
| MLPA | Do inglês, <i>Multiplex Ligation dependent Probe Amplification</i> |
| MM | Massa Magra |
| NC/NC | Mutação não clássica/não clássica |
| NC-HAC-21OH | Forma não clássica da HAC-21OH |
| PCRus | Proteína C reativa ultrasensível |
| RIA | Radioimunoensaio |
| SOP | Síndrome dos Ovários Policísticos |
| Tale | Termo de Assentimento Livre e Esclarecido |
| TART | Tumores de restos adrenais em testículos |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| TG | Triglicerídeos |
| TNF-alfa | Fator de Necrose Tumoral-alfa (do inglês, <i>tumor necrosis factor-alfa</i>) |
| <i>TNXA</i> | Pseudogene da proteína de matriz extracelular tenascin-X |
| <i>TNXB</i> | Gene codificador da proteína de matriz extracelular tenascin-X |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 05 |
| ABSTRACT | 06 |
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 Deficiência de 21-hidroxilase | 15 |
| 1.2 Formas clínicas da HAC-21OH | 16 |
| 1.3 Diagnóstico clínico e laboratorial | 16 |
| 1.4 Aspectos moleculares | 19 |
| 1.5 Tratamento | 22 |
| 1.6 Complicações em longo prazo | 26 |
| 1.6.1 Risco cardiovascular | 27 |
| 1.7 Resistência insulínica e métodos de avaliação | 29 |
| 1.8 Obesidade, Adipocinas e inflamação | 30 |
| 1.9 Avaliação de composição corporal | 31 |
| 1.10 Justificativa da pesquisa | 32 |
| 1.11 Hipótese | 33 |
| 2 OBJETIVOS | 35 |
| 2.1 Geral | 35 |
| 2.2 Específicos | 35 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 37 |
| 3.1 Desenho do estudo | 37 |
| 3.2 Aspectos éticos | 37 |
| 3.3 Critérios de inclusão e exclusão | 38 |
| 3.4 População e amostra | 38 |
| 3.5 Coleta de dados | 39 |
| 3.5.1 Análise retrospectiva | 39 |
| 3.5.2 Análise prospectiva | 40 |
| 3.5.2.1 Avaliação clínica | 40 |
| 3.5.2.2 Bioimpedância | 41 |
| 3.5.2.3 Exames laboratoriais | 42 |
| 3.5.2.4 Ultrassom de artérias carótidas | 43 |
| 3.5.2.5 Composição corporal por dupla emissão de raio-X (DXA) | 44 |
| 3.5.2.6 Sensibilidade e Resistência à Insulina | 44 |
| 3.5.2.6.1 HOMA-IR - <i>Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance Index</i> | 44 |
| 3.5.2.6.2 <i>Clamp</i> Euglicêmico-Hiperinsulinêmico | 44 |
| 3.6 Processamento e análise dos dados | 46 |
| 4 RESULTADOS | 48 |
| 5 DISCUSSÃO | 61 |
| 6 CONCLUSÃO | 69 |
| REFERÊNCIAS | 72 |
| APÊNDICES | 84 |
| Apêndice 1 - Formulário de registros da avaliação clínica | 85 |
| Apêndice 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Adulto. Grupo | 86 |

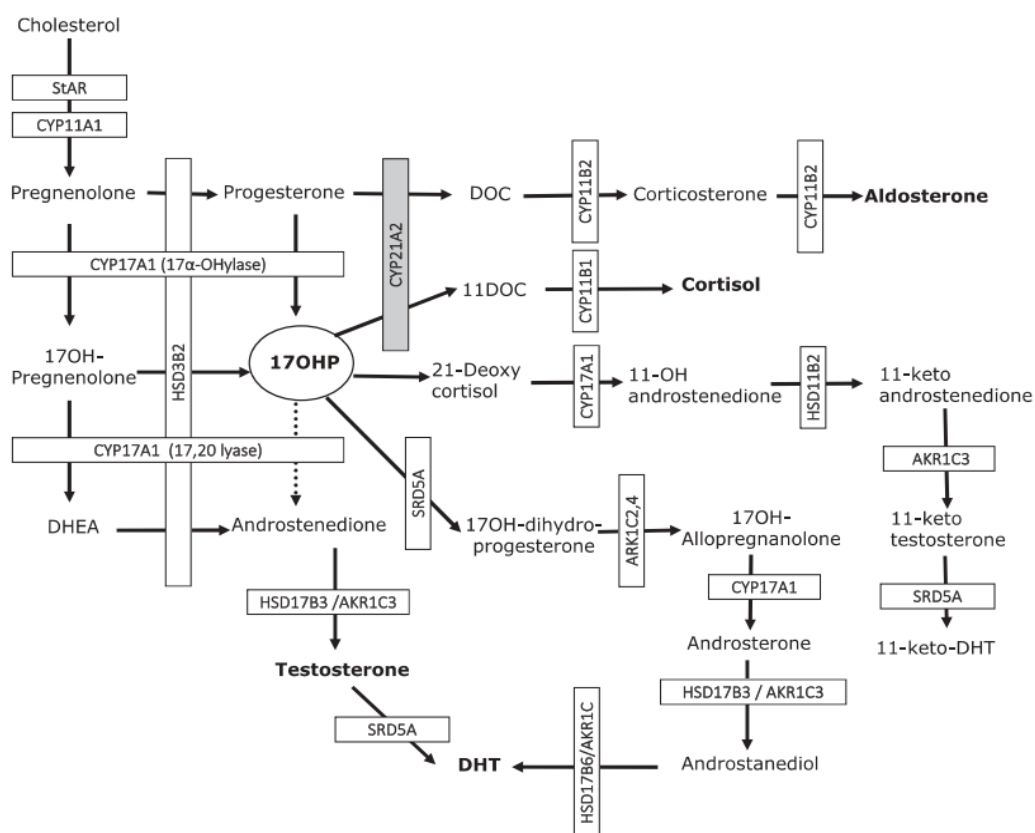
| | |
|---|-----|
| Condição Clínica | |
| Apêndice 3 - Termo de Assentimento Livre e Esclarecido – Criança e Adolescente. Grupo Condição Clínica | 88 |
| Apêndice 4 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Responsáveis. Grupo Condição Clínica | 90 |
| Apêndice 5 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Adultos. Grupo Controle | 92 |
| Apêndice 6 - Termo de Assentimento Livre e Esclarecido – Crianças e Adolescentes. Grupo Controle | 94 |
| Apêndice 7 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Responsáveis. Grupo Controle | 96 |
| | |
| ANEXOS | 98 |
| Anexo 1 - <i>Clamp</i> Euglicêmico-Hiperinsulinêmico. Protocolo Padrão – Adaptado do Limed/Unicamp. Laboratório de Diabetes e Metabolismo – HC/FMRP/USP | 99 |
| Anexo 2 - Formulário de Registro - <i>Clamp</i> Euglicêmico-Hiperinsulinêmico | 107 |
| Anexo 3 - Autorização da Pesquisa no HC/FMRP/USP | 108 |
| Anexo 4 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa | 109 |
| Anexo 5 - Aceite de publicação de artigo oriundo da tese | 115 |

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A hiperplasia adrenal congênita (HAC) se caracteriza por um conjunto de doenças genéticas de transmissão autossômica recessiva que resultam em redução da produção de cortisol por deficiência de uma das enzimas envolvidas na esteroidogênese adrenal ou nas proteínas correguladoras, StAR e P450. A deficiência dessas enzimas provoca efeitos em cascata. Devido à falta de cortisol circulante, ocorre perda na retroalimentação negativa desse hormônio sobre o eixo hipotálamo-hipófise e consequente estímulo ao hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), com efeito trófico sobre o córtex da adrenal, culminando na hiperplasia da glândula e superestimulação das vias não afetadas pelo defeito enzimático (Turcu; Auchus, 2015; Speiser; White, 2003). Um esquema da esteroidogênese normal é apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Esteroidogênese do córtex adrenal



Em cinza, a localização da CYP21A2, deficiente na HAC-21OH. StAR: proteína regulatória aguda da esteroidogênese; CYP11A1: enzima de clivagem lateral do colesterol; DOC: deoxicorticosterona; CYP11B2: aldosterona sintase; CYP21A2: 21-hidroxilase; 11DOC: 11-deoxicorticosterona; CYP11B1: 11β-hidroxilase;

HSD3B2: 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2; 17-OHP: 17-hidroxiprogesterona; HSD11B2: 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2; DHEA: dehidroepiandrosterona; SRD5A: 5 α -redutase; AKR1C3: aldoceto-redutase; DHT: dihidrotestosterona.

Fonte: Nordenström; Falhammar, 2019.

1.1 Deficiência de 21-hidroxilase

A HAC por deficiência de 21-hidroxilase (HAC-21OH) é o defeito enzimático adrenal mais frequente, sendo responsável por cerca de 95% dos casos (El-Maouche; Arlt; Merke, 2017; Merke; Auches, 2020). A diminuição dos níveis de cortisol e a consequente hipersecreção de ACTH resultam em produção aumentada de precursores androgênicos proximais ao sítio do defeito (Gomes *et al.*, 2017).

Em decorrência da alteração na função da 21-hidroxilase (21OH), as conversões de progesterona para 11-desoxicorticosterona e de 17-hidroxiprogesterona (17OHP) para 11-desoxicortisol estão alteradas, prejudicando a síntese de aldosterona e cortisol respectivamente (Speiser; White, 2003; Hayashi *et al.*, 2017), com desvio dos precursores para a síntese de dehidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona, que serão convertidas em testosterona nos tecidos periféricos (Hayashi *et al.*, 2017; Merke *et al.*, 2002).

A primeira descrição de HAC-21OH ocorreu em 1865, com paciente masculino que manifestou crise adrenal e evolução para morte após quadro de vômito e diarreia. Na autópsia, observou-se presença de genitália feminina com falo de 6cm e aumento de glândulas adrenais. Em 1957, 92 anos depois, uma mulher de 26 anos com acne, hirsutismo, ciclos menstruais regulares e genitália feminina apresentou aumento de 17OHP basal e após estímulo de ACTH, sendo o primeiro caso da forma não clássica descrito na literatura (Falhammar; Nordenström, 2015; Merke; Auches, 2020).

No Brasil, os primeiros estudos que descrevem pacientes com HAC-21OH são da década de 90 (Leite *et al.*, 1991; Bachega *et al.*, 1998), incluindo uma coorte de 11 pacientes conduzida por nosso grupo, com a descrição de aspectos clínicos e laboratoriais na forma não clássica da HAC-21OH (Elias; Moreira, 1992).

Estudos de prevalência apontam, em recém-nascidos avaliados pela triagem neonatal, prevalência de 1 em cada 10.000 a 20.000 nascidos vivos para a forma clássica de HAC-21OH (NC-HAC-21OH). Já a forma não clássica é mais comum,

com prevalência estimada em 1 caso a cada 200 a 1.000 pessoas (Merke; Auches, 2020).

1.2 Formas clínicas da HAC-21OH

Agrupam-se os pacientes em duas formas clínicas: clássica e não clássica. O espectro clínico da doença é variável e depende do grau de defeito enzimático. A forma clássica resulta de mutações genéticas com grave prejuízo da atividade enzimática e, conseqüentemente, na produção de cortisol e aldosterona. É subdividida em forma perdedora de sal e virilizante simples, baseada na capacidade residual da adrenal de produzir pequenas quantidades de aldosterona na forma virilizante simples (Mooji *et al.*, 2010). As manifestações se iniciam ainda intraútero e se sobrepõem, de modo que a diferenciação entre forma perdedora de sal e virilizante simples tem pouca relevância clínica, já que ambas apresentam algum grau de perda de sal (Merke; Auches,).

A forma não clássica, por outro lado, decorre de mutações com menor prejuízo na atividade da 21OH, que é mantida em torno de 30%-50%, resultando em apresentações mais brandas da mesma doença e que ocorrem mais tardiamente na infância, adolescência ou fase adulta (Kim; Merke, 2009), com ausência de virilização pré-natal (Speiser *et al.*, 2018).

1.3 Diagnóstico clínico e laboratorial

A deficiência de 21OH se apresenta como um espectro de atividade enzimática, sendo que o hiperandrogenismo é observado desde a vida intrauterina na forma clássica da doença, enquanto, na forma não clássica, essa manifestação é mais tardia, ocorrendo na infância, adolescência ou fase adulta. É importante destacar que as formas clínicas da HAC-21OH não representam diferentes doenças, mas sim um contínuo espectro na gravidade da deficiência de 21OH (Bachega *et al.*, 2004).

Setenta e cinco por cento dos casos de forma clássica apresentam a forma perdedora de sal, que, além da hiperprodução androgênica, apresenta também deficiência mais grave na produção de aldosterona, levando à desidratação com

hiponatremia e hipercalemia nos primeiros dias de vida, podendo levar ao choque e óbito (Merke; Auches, 2020).

A forma clássica é a causa mais comum de atipia genital em pacientes 46,XX e a principal causa de insuficiência adrenal primária na infância (Merke; Auches, 2020). Como a intensidade do bloqueio enzimático é variável, a genitália externa pode se apresentar com diferentes graus de virilização, descrita pela classificação de Prader, desde leve clitorimegalia (Prader 1) até fusão completa de pregas labiais, assemelhando-se a uma genitália externa masculina, porém sem gônadas palpáveis (Prader 5) (Claasen-van der Grinten *et al.*, 2021). No genótipo 46,XY, pode haver macrogenitossomia neonatal e hiperpigmentação escrotal, alterações que frequentemente passam despercebidas, sendo mais comum o desenvolvimento de hiperandrogenismo nos primeiros 6 a 12 meses de vida (Speiser; White, 2003).

Em ambos os sexos, a secreção excessiva de andrógenos pela adrenal também resulta em rápido crescimento somático, com avanço da idade óssea durante os primeiros anos de vida. Quando há tratamento inadequado ou ausência de tratamento, os pacientes podem evoluir com baixa estatura e puberdade precoce devido à fusão precoce das epífises (Merke; Auches, 2020).

A forma não clássica caracteriza-se pela ausência de virilização pré-natal, e as principais manifestações clínicas são: pubarca precoce na infância, hirsutismo, irregularidade menstrual, acne e infertilidade na adolescência e vida adulta, podendo até mesmo ser assintomática. O prejuízo na produção da aldosterona e cortisol não resulta em comprometimento clínico nesses pacientes (Speiser *et al.*, 2018; Mooji *et al.*, 2010). As mulheres adultas perfazem grande parte dos diagnósticos dessa forma da doença, homens adultos, por sua vez, apresentam produção testicular de androgênios muito superior à produção adrenal, sendo raramente diagnosticados com a forma não clássica da HAC-21OH. Destarte, o diagnóstico em homens adultos em geral é realizado nos portadores de casos familiares, acne grave, infertilidade ou naqueles com incidentalomas adrenais.

O diagnóstico da HAC-21OH é baseado na dosagem de 17OHP, principal substrato da enzima 21OH. A coleta deve ser realizada pela manhã e na fase folicular em mulheres na menacme. Valores basais acima de 1.000 ng/dL confirmam o diagnóstico, sendo que a maioria das crianças afetadas, especialmente na forma clássica, apresentarão valores acima de 5.000 ng/dL.

Valores abaixo de 200 ng/dL usualmente excluem o diagnóstico (Merke; Auches, 2020). Valores de 17OHP intermediários (200-1000 ng/dL) requerem realização do teste de estímulo com ACTH, no qual se realiza a dosagem basal de 17OHP, seguida da administração endovenosa de 0,25 mg de ACTH sintético e dosagem 17OHP após 60 minutos. Resultados acima de 1.000 ng/dL após estímulo confirmam o diagnóstico (El-Maouche; Arlt; Merke; 2017; Speiser *et al.*, 2018). LC-MS/MS (espectrometria de massa por cromatografia em fase líquida) é mais sensível do que os ensaios tradicionais para a determinação da 17OHP circulante. Porém, esse método ainda não está amplamente disponível e há discussão se o valor de corte para o diagnóstico deve ser mudado. A dosagem de androstenediona, testosterona e DHEAS auxilia no diagnóstico diferencial de causas mais raras de HAC (El-Maouche; Arlt; Merke; 2017).

A triagem neonatal para HAC-21OH teve início no Alaska, em 1977, e hoje está presente em mais de 40 países (Merke; Auches, 2020). A dosagem de 17OHP a partir de gotas de sangue coletadas em papel filtro permite o diagnóstico precoce, reduzindo a morbimortalidade da doença (Claasen-van der Grinten *et al.*, 2021), prevenindo a maturação óssea precoce e a redesignação sexual em meninas com virilização (Miranda *et al.*, 2021). O resultado falso-positivo ocorre especialmente em neonatos prematuros, e todos aqueles com rastreio positivo devem ser submetidos a avaliações adicionais para confirmação do resultado (Miranda *et al.*, 2019).

No Brasil, um programa piloto de triagem foi implementado na cidade de São Paulo, em 2009 (Hayashi *et al.*, 2011), sendo que o programa nacional de triagem neonatal incluiu a avaliação da HAC apenas no ano de 2013 e, ainda hoje, apresenta dificuldades de implementação em regiões mais pobres do país (Hayashi *et al.*, 2017; Kopacek *et al.*, 2017). Miranda e *cols.* demonstraram custo-efetividade na realização da triagem neonatal no Brasil ao reduzir complicações do diagnóstico tardio da HAC-21OH e mitigar os danos físicos e psicológicos da doença (Miranda *et al.*, 2019; Miranda *et al.*, 2021).

Parte da 17OHP é metabolizada a 21-deoxicortisol, que, diferentemente da 17OHP, não é sintetizado pelas gônadas, podendo ser utilizado como biomarcador adrenal mais específico que a 17OHP. Alguns protocolos de triagem neonatal já incluíram essa dosagem rotineiramente (Merke; Auches, 2020).

1.4 Aspectos moleculares

A enzima 21OH é uma proteína da família do citocromo P450 codificada pelo gene *CYP21A2*, localizado no braço curto do cromossomo 6 (região 6p21.3). É composta de dez éxons e codifica uma enzima microsomal, CYP21A2, de 494 ou 495 aminoácidos com 55 kDa. O *CYP21A1P* é um pseudogene homólogo àquele e não codifica proteínas devido à presença de várias mutações deletérias (Morel *et al.*, 1989).

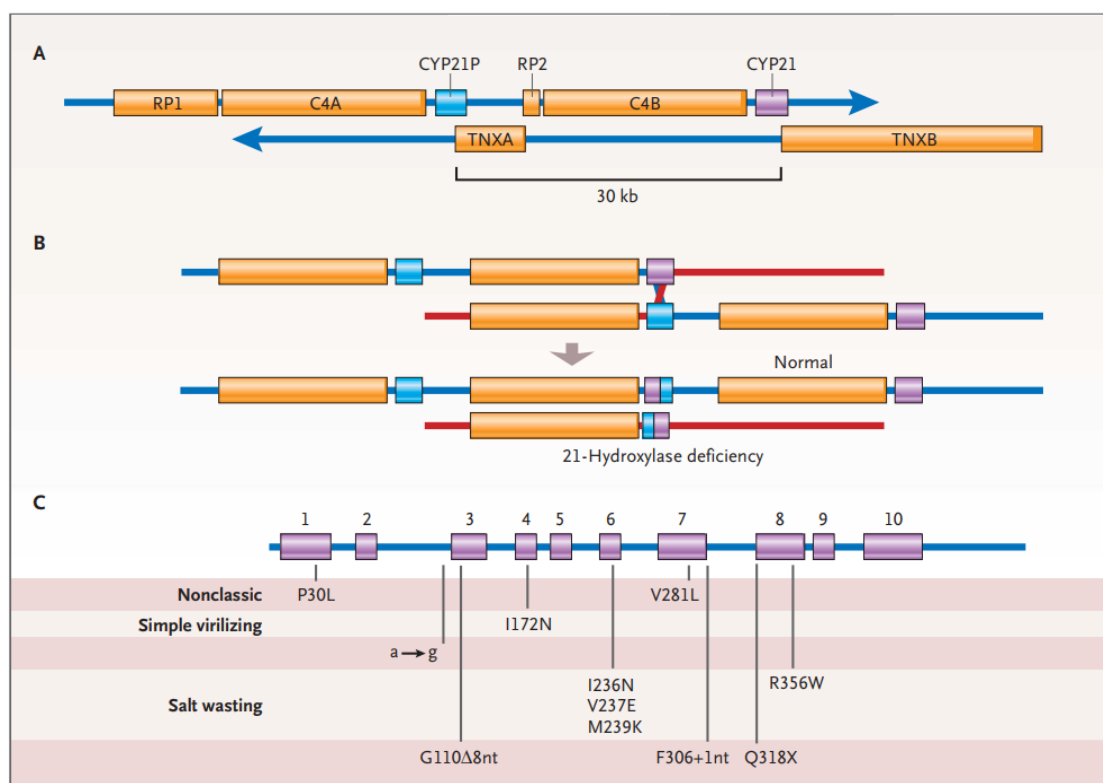
Os genes *CYP21A2* e *CYP21A1P* se estendem sobre uma região próxima, de aproximadamente 30 Kb, alternando com os genes *C4A* e *C4B*, que codificam o quarto componente do complemento sérico; os genes *RP1* e seu pseudogene *RP2*, que codificam uma proteína quinase nuclear; e *TNXB* e seu pseudogene *TNXA*, que codificam proteína de matriz extracelular (Bidet *et al.*, 2010; de Carvalho *et al.*, 2016). Essa região de genes duplicados e alto grau de identidade dos seus nucleotídeos favorecem o emparelhamento desigual dos cromossomos homólogos durante a meiose, o que pode levar ao aparecimento de duplicações, deleções e conversões gênicas (Miller, 1988).

A HAC-21OH ocorre principalmente devido a alterações provenientes do pseudogene *CYP21A1P*, conhecidas como microconversões, mutações raras e grandes rearranjos gênicos (Harrington *et al.*, 2012). Mais de 200 mutações são atualmente descritas e estão listadas no *Human Gene Mutation Database* (HGMD, disponível em: <http://www.hgmd.cf.ac.uk>) e *Pharmacogene Variation Consortium* (disponível em: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP21A2>) (Claasen-van der Grinten *et al.*, 2021).

Cerca de 75% das alterações de *CYP21A2* são devido a microconversões, ou seja, mutações pontuais ou conjuntos de mutações que, na maioria das vezes, são provenientes do seu pseudogene *CYP21A1P*. Na Figura 2, são demonstradas as principais alterações provenientes do pseudogene. A alteração IVS2-13A/C>G, que cria um *site* de *splice* alternativo no *intron* 2, é a mais frequente nas 15 nacionalidades diferentes. A segunda mais frequente é a p.I172N no *éxon* 4, seguida da p.V281L no *éxon* 7. As outras alterações se distribuem de maneira mais uniforme (Coeli-Lacchini *et al.*, 2013; Claasen-van der Grinten *et al.*, 2021). Mutações raras ou novas correspondem a 3%-5% das mutações detectadas em

grandes coortes. A maioria dessas mutações raras são identificadas em famílias pequenas. Aproximadamente, 1% a 2% das variantes encontradas na doença são mutações de novo (Claasen-van der Grinten *et al.*, 2021).

Figura 2 – Região cromossômica contendo o gene *CYP21*



Região do cromossomo 6p21.3 contendo o gene *CYP21* da 21-hidroxilase (A), pareamento desigual dos genes na meiose (B) e as principais mutações responsáveis pela Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência de 21 hidroxilase (C). As setas indicam o sentido da transcrição gênica (A).

No painel A, *CYP21* e *CYP21P* indicam o gene ativo e pseudogene da 21-hidroxilase, respectivamente. *C4A*, componente do complemento C4A; *C4B*, componente do complemento C4B; *TNXB*, tenascin X; *TNXA*, pseudogene tenascin X. a barra que delimita a região de 30kb é deletada em 20% dos genes defeituosos da 21-hidroxilase.

No painel B, o gene da 21-hidroxilase sofre pareamento desigual durante a meiose, resultando em gene não funcional pela ampla deleção.

No painel C, observam-se as mutações do gene *CYP21P*, que podem ser transferidas ao *CYP21* por meio de conversões gênicas. O comprometimento enzimático é denotado pela posição de cada mutação na escala, com as mutações menos severas demonstradas inicialmente (*nonclassic*) e as mais severas, resultantes na forma clássica, mostradas abaixo (*simple virilizing* e *salt wasting*).

Fonte: Speiser; White, 2003.

Deleções do gene *CYP21A2* ocorrem em cerca de 25% dos alelos nas formas perdedoras de sal em diversas populações caucasianas e do oeste europeu. Baixa frequência de deleções tem sido restrita a populações específicas, tais como nas populações mexicana e japonesa (<2%), na população argentina

(7%) e no Brasil (4% a 7%), dados obtidos em dois estudos populacionais (de Araujo *et al.*, 1996; Bachega *et al.*, 1999).

No mecanismo de conversão gênica, ocorre a transferência de sequências deletérias do pseudogene para o gene ativo. A frequência das grandes conversões ou macroconversões varia de 10% a 15% entre as diversas populações, estando presente principalmente na forma clássica (Coeli-Lacchini *et al.*, 2013). Na população brasileira, sua frequência foi estimada em torno de 17%, considerando apenas a forma clássica, e de 7% quando foram incluídas as três formas clínicas (Bachega *et al.*, 1999).

A grande variabilidade fenotípica da HAC-21OH resulta dos diferentes graus de comprometimento da atividade enzimática decorrentes dessas mutações, com correção genótipo-fenótipo de cerca de 90%-95% (de Carvalho *et al.*, 2016; Claasen-van der Grinten *et al.*, 2021). Estudos de mutagênese "*in vitro*" permitiram quantificar a redução da atividade enzimática conferida por cada mutação, sendo divididas em três grupos, de acordo com a gravidade do comprometimento (Higashi *et al.*, 1991).

O grupo A (grave comprometimento enzimático) incluiu as mutações $\Delta 8$, p.Q318X, p.R356W, IVS2-13A/C>G, com atividade enzimática ausente ou mínima (0% a 2%). As mutações do tipo *frameshift* e mutações *nonsense* alteram drasticamente a estrutura e a função da proteína, abolindo completamente a atividade enzimática (Speiser *et al.*, 1992). Essas mutações estão associadas com a forma clínica mais grave, perdedora de sal.

Mutações do tipo *missense* podem dar origem a diversas formas fenotípicas da deficiência da 21-hidroxilase. O grupo B (moderado comprometimento enzimático) incluiu a mutação p.I172N, que confere entre 3% e 7% de atividade enzimática. O grupo C (leve comprometimento enzimático) incluiu as mutações p.P30L e p.V281L, as quais conferem atividade enzimática residual entre 20%-60% (Speiser *et al.*, 1992).

Deve-se considerar que, na heterozigose com duas mutações diferentes (heterozigotos compostos), a forma clínica é conferida pelo alelo com maior atividade enzimática. Sendo assim, a forma clínica perdedora de sal seria determinada pela combinação de duas mutações graves, a virilizante simples por

uma grave e uma intermediária ou por duas intermediárias e a forma não clássica por duas mutações brandas (genótipo NC/NC) ou uma branda combinada com uma grave ou intermediária (genótipo C/NC) (Speiser *et al.*, 1992).

Apesar dos avanços na genotipagem, a dosagem de 17OHP permanece como padrão para estabelecer o diagnóstico. O *locus* da *CYP21A2* é complexo, e a presença de deleções, duplicações e do pseudogene *CYP21A1P* torna difícil a diferenciação de carreadores e doentes, muitas vezes sendo necessária a genotipagem parental para confirmação do genótipo (Merke; Auches, 2020).

Estudos populacionais apontam a correlação entre o grau de comprometimento enzimático conferido pelo genótipo com os valores hormonais basais da 17OHP (Bachega *et al.*, 2000, Torres *et al.*, 2003). Entretanto, outros estudos de correlação do genótipo com o fenótipo verificaram que nem sempre ocorre a associação esperada (Moura-Massari *et al.*, 2013). Os fatores que podem ser responsáveis por essa disparidade são a presença de outras mutações mais raras num mesmo alelo, anormalidades em regiões promotoras e regulatórias do gene *CYP21A2* ou a presença de atividade de 21-hidroxilação extra-adrenal mediada por outras enzimas além da P450c21 (Araújo *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2009).

O estudo da correlação genótipo-fenótipo na forma NC-HAC-21OH tem contribuído para o melhor entendimento dos graus de comprometimento enzimático e do espectro clínico da doença. Observou-se em estudo preliminar que a presença de uma mutação branda combinada com uma grave ou intermediária (genótipo C/NC) resultava em maiores valores de 17OHP basal e após estímulo com ACTH quando comparado à presença de duas mutações brandas (genótipo NC/NC) (Mermejo *et al.*, 2019).

1.5 Tratamento

O tratamento com glicocorticoides busca a reposição de modo semelhante à fisiológica, visando reduzir o estímulo excessivo do ACTH com redução subsequente da produção de androgênios. Enquanto, na infância, manter o

crescimento e desenvolvimento puberal normais é o principal objetivo, na fase adulta, a manutenção da fertilidade torna-se mais relevante (Artl *et al.*, 2010).

O tratamento da forma clássica da HAC-21OH visa à reposição de glico e mineralocorticoides. O objetivo é prevenir a crise de perda de sal, virilização genital e outras complicações, discutidas a seguir (Claasen-van der Grinten *et al.*, 2021).

A reposição com glicocorticoides apresenta três principais desafios. Primeiro, as formulações de glicocorticoides disponíveis não mimetizam completamente o ritmo circadiano do cortisol, com o aumento fisiológico nas primeiras horas da manhã, pico de concentração entre 6-8 horas da manhã e nadir noturno à meia-noite. O segundo desafio se prende ao fato de que a biossíntese de cortisol como resposta adaptativa ao estresse apenas é possível por meio da reposição por bomba de infusão contínua, que, além de ser pouco disponível, também não é custo-efetiva. E o terceiro desafio é que, para restaurar a retroalimentação negativa na secreção de ACTH hipofisário e reduzir o estímulo à formação de androgênios, são necessárias doses suprafisiológicas de glicocorticoide, muito acima daquelas utilizadas para outras formas de insuficiência adrenal (Claasen-van der Grinten *et al.*, 2021).

O limiar entre hipercortisolismo e hiperandrogenismo é estreito, sendo fundamental a prevenção de complicações associadas ao excesso de glicocorticoides, até mesmo por sua associação com maior risco cardiovascular (Mooji *et al.*, 2010).

Em crianças com puberdade precoce ou rapidamente progressiva ou aumento da velocidade de crescimento, a droga de escolha é a hidrocortisona nas doses de 10-15 mg/m²/d, fracionada duas-três vezes ao dia. Como a hidrocortisona oral não está disponível no Brasil, o tratamento também pode ser feito com o acetato de cortisona, que possui uma biodisponibilidade de apenas 80% quando comparada à hidrocortisona e necessita da ação da enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase (11 β -HSD) hepática para conversão a cortisol, o composto ativo. Em crianças, o glicocorticoide de meia-vida curta deve ser usado, pois compromete menos o crescimento linear, preservando o potencial de crescimento e o desenvolvimento puberal normal (Speiser *et al.*, 2018).

Revisões sistemáticas e metanálises têm sugerido que exceder a dose equivalente de 17 mg/m² por dia de hidrocortisona, especialmente durante a infância e adolescência, está associada a desfechos clínicos mais desfavoráveis (Muthusamy *et al.*, 2010).

No período pós-puberal, em pacientes com infertilidade relacionada à HAC-21OH ou mulheres com manifestações de hiperandrogenismo, há preferência por uso de glicocorticoide de meia-vida longa, como a dexametasona, em dose única de 0,25-0,5 mg/dia ou prednisona na dose de 5-7,5 mg/dia (Speiser *et al.*, 2018).

Em revisão e metanálise realizada em 2019, foram avaliados 23 estudos e concluiu-se que a dexametasona permite maior grau de supressão adrenal, porém os pacientes que estavam em uso da dexametasona apresentaram menores valores de densidade mineral óssea e maior IMC, sem diferenças significativas nesses parâmetros ao se analisarem pacientes tratados com hidrocortisona e prednisolona (Whittle; Falhammar, 2019). Adicionalmente, Seraphim e cols. avaliaram adultos portadores da forma clássica de HAC-21OH em uso de dexametasona por 11,5 anos em média e encontraram aumento no índice HOMA-IR e na relação cintura-estatura (Seraphim *et al.*, 2019).

O acompanhamento da reposição de glicocorticoide é realizado pela avaliação clínica dos sinais de hiperandrogenismo ou hipercortisolismo. Adicionalmente, a monitorização laboratorial é feita pela determinação periódica de androstenediona e testosterona, que devem estar normais para idade e sexo (Speiser *et al.*, 2018). Nos homens, após a puberdade, apenas a androstenediona serve como parâmetro de bom controle hormonal, pois a testosterona também é produzida pelos testículos (White; Bachega, 2012).

Em contrapartida à forma clássica, os pacientes com a forma não clássica não dispõem de diretrizes específicas para seguimento e acompanhamento, e as evidências disponíveis são baixas. A decisão sobre o início do tratamento deve ser individualizada e baseada especialmente nas manifestações clínicas, sem recomendação para tratamento de rotina daqueles indivíduos assintomáticos (Speiser *et al.*, 2018; Claasen-van der Grinten *et al.*, 2021).

Na infância, a monitorização clínica de crescimento, peso, sinais de hiperandrogenismo, progressão da puberdade e avanço de idade óssea é

mandatória para garantir o adequado crescimento e desenvolvimento puberal (Claasen-van der Grinten *et al.*, 2021).

Em mulheres adultas com a forma não clássica, nas quais é mais comum o diagnóstico dessa forma da doença, os principais sintomas são hirsutismo, oligo ou amenorreia, acne, alopecia e infertilidade. O hirsutismo é a queixa mais prevalente, sendo de difícil manejo clínico. Contraceptivos orais reduzem a produção e ação dos androgênios e aumentam a proteína ligadora de hormônios sexuais, reduzindo efetivamente os sintomas de hiperandrogenismo, especialmente aqueles contendo ciproterona, dianogeste e drosperinona. Um estudo com 30 mulheres portadoras da forma NC-HAC-21OH demonstrou que acetato de ciproterona é mais efetivo que hidrocortisona para controle clínico com a queixa mais preponderante de hirsutismo (Spritzer *et al.*, 1990; Claasen-van der Grinten *et al.*, 2021).

Espironolactona, flutamida e finasterida também podem ser usados para tratar o hirsutismo, acne e alopecia androgenética, porém apresentam efeito teratogênico. Tratamentos cosméticos locais podem ser efetivos, como depilação com lâmina, avulsão com pinça ou cera, luz pulsada ou por radiofrequência. Creme de eflortinina tópico pode ser usado para tratamento de hirsutismo facial, inibindo a fase anágena do crescimento piloso. Essas pacientes não apresentam deficiências clinicamente relevantes de glicocorticoides ou mineralocorticoides e, portanto, o tratamento deve ser considerado apenas naquelas com sintomas de hiperandrogenismo que não responderem a outras terapias disponíveis para esse fim, discutindo riscos, benefícios e efetividade das terapias disponíveis (Speiser *et al.*, 2018; Claasen-van der Grinten *et al.*, 2021).

Homens adultos raramente são diagnosticados com a forma NC-HAC-21OH e, em geral, não necessitam de tratamento. A presença de tumores de restos adrenais em testículos (TART) tem sido descrita em poucos homens portadores da forma não clássica (Shaw *et al.*, 2006; O'Shaughnessy *et al.*, 2019; Claasen-van der Grinten *et al.*, 2021).

Embora glicocorticoides e mineralocorticoides sejam utilizados para tratamento da HAC-21OH, não são infrequentes os problemas de baixa estatura, alterações puberais, irregularidade menstrual, hiperandrogenismo, obesidade, infertilidade e disfunção sexual, mesmo naqueles pacientes considerados

adequadamente tratados (Jääskeläinen *et al.*, 2000). Adicionalmente, vem sendo estudadas novas formulações de glicocorticoides que mimetizem o ritmo circadiano do cortisol de forma mais próxima à fisiológica (Mallappa *et al.*, 2015; El-Maouche *et al.*, 2020; Auchus *et al.*, 2021), além de drogas que diminuam o hiperandrogenismo nas mulheres através do bloqueio da enzima P450c17 envolvida na produção de andrógenos (Auchus *et al.*, 2014).

1.6 Complicações em longo prazo

Com a introdução do tratamento com glicocorticoides, a HAC tornou-se uma doença crônica (Mooji *et al.*, 2010). Na criança, o foco do seguimento deve ser o crescimento e o desenvolvimento puberal, enquanto, na transição para o adulto com HAC-21OH, a prioridade do tratamento passa a ser a manutenção da capacidade reprodutiva e da qualidade de vida e o manejo de complicações em longo prazo (Auchus, 2015; Reisch *et al.*, 2011).

A manutenção da fertilidade é um importante aspecto no tratamento desses pacientes, pois pode estar reduzida em homens e mulheres com HAC-21OH comparados com controles (Hagenfeldt *et al.*, 2008). A manutenção do bom controle hormonal é importante para prevenir o desenvolvimento de irregularidade menstrual, hirsutismo, síndrome de ovários micropolicísticos na mulher e para permitir a fertilidade normal em ambos os sexos (Bidet *et al.*, 2010; Casteras *et al.*, 2009). Vários estudos têm demonstrado os efeitos deletérios da hiperestimulação crônica do tecido adrenal pelo ACTH, como TART (Smeets *et al.*, 2015) e o desenvolvimento de nódulos adrenais (Mermejo *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2014). O tratamento principal é a intensificação do uso de glicocorticoide (dexametasona 0,75-2,0 mg/dia) a fim de suprimir o ACTH e seu efeito estimulatório sobre esses tumores (Claahsen-van der Grinten *et al.*, 2008).

O estudo britânico CaHASE mostrou que mulheres com HAC-21OH em tratamento apresentavam estrias e obesidade, sugerindo excesso de tratamento (Arlt *et al.*, 2010). Adicionalmente, baixa estatura, obesidade, síndrome metabólica e risco cardiovascular também têm sido observados (Kim; Mercke, 2009; Sartorato *et al.*, 2007) e o aumento na hipertensão arterial ainda é divergente em alguns

estudos. Também tem sido descritas diminuição da densidade mineral óssea e osteopenia, sendo inversamente proporcionais à dose acumulada de glicocorticoide, enquanto osteoporose é incomum (Arlt *et al.*, 2010; Sartorato *et al.*, 2007).

Tanto o hiperandrogenismo quanto o excesso de tratamento na HAC-21OH podem causar resistência à insulina (Reisch; Arlt; Krone, 2011), portanto a dose e a duração do tratamento da HAC-21OH representam um dos principais desafios, especialmente na forma não clássica da doença, que muitas vezes não necessita da manutenção do tratamento com glicocorticoides. Sendo assim, a obtenção de dados sobre as consequências da doença e seu tratamento é extremamente relevante. Porém, coortes de longo prazo são escassas (Arlt *et al.*, 2010). Um estudo recente avaliou um grupo de 60 adultos portadores da forma clássica de HAC-21OH em uso de dexametasona por 11,5 anos e demonstrou aumento no índice HOMA-IR e na relação cintura-estatura nesses pacientes (Seraphim *et al.*, 2019).

1.6.1 Risco cardiovascular

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte global na atualidade e a identificação de indivíduos em risco é importante para um manejo clínico mais adequado (Wong; Tse, 2021). Como as anormalidades metabólicas são relacionadas à patogênese da aterosclerose, a investigação de alterações que resultem em aumento do risco cardiovascular é necessária em portadores de HAC-21OH. Ainda não está claro se as alterações metabólicas são decorrentes da própria doença ou do tratamento em longo prazo, ou ainda de ambos (Reisch; Arlt; Krone, 2011).

A prevalência de sobrepeso e obesidade foi maior em adultos com HAC-21OH no Reino Unido (Arlt *et al.*, 2010), Suécia (Falhammar *et al.*, 2015) e Brasil (Moreira *et al.*, 2013), mas semelhante à população geral na França (Bouvattier *et al.*, 2015) e nos Estados Unidos (Finkelstein *et al.*, 2012). Aumento da adiposidade abdominal foi observado em adolescentes e adultos jovens com HAC-21OH comparados com controles pareados para sexo, idade e IMC; e síndrome metabólica esteve presente em cerca de 20% dos adultos em uma coorte

americana, sem relação com androgênios, tipo ou dose de glicocorticoide (Finkelstain *et al.*, 2012).

Em revisão sistemática e metanálise incluindo 20 estudos observacionais (14 longitudinais e seis transversais), a dose média de glicocorticoide foi de 9 a 26,5 mg/m²/dia em equivalente de hidrocortisona. Na metanálise, foram avaliados 416 pacientes, com idade variando de 14 meses a 63 anos e demonstrado que os pacientes apresentaram maior índice HOMA-IR (Tamhane *et al.*, 2018).

Estudos que avaliaram a pressão arterial encontraram aumento da pressão arterial sistólica noturna e diurna em crianças, quando comparadas a controles pareados (Mooij *et al.*, 2010; Ubertini *et al.*, 2009), enquanto outros estudos encontraram valores de pressão normal (Finkelstain *et al.*, 2012; Bouvattier *et al.*, 2015). Poucos dados de prevalência de hipertensão em adultos com HAC-21OH são disponíveis (Claasen-van der Grinten *et al.*, 2021).

A medida da espessura da camada mediointimal (CMI) das artérias é considerada uma avaliação de aterosclerose subclínica e está associada a aumento do risco cardiovascular. A maioria dos estudos em pacientes com HAC-21OH incluiu pacientes mais jovens, sendo difícil avaliar a morbimortalidade cardiovascular nessa população (Claasen-van der Grinten *et al.*, 2021).

Alguns estudos com análise desse parâmetro na forma clássica da HAC-21OH descreveram maior espessura da CMI, porém ainda há poucos estudos e nenhum com a forma não clássica da doença (Sartorato *et al.*, 2007, Ariyawatkul *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2015). O mesmo achado também foi descrito em revisão sistemática e metanálise (Tamhane *et al.*, 2018), e, em outro estudo, a espessura da CMI se correlacionou positivamente a IMC e pressão arterial sistólica (Jourdan *et al.*, 2005).

A maioria dos estudos envolvendo a medida da espessura da CMI das carótidas encontrou resultados variáveis e sem relação com dose cumulativa de glicocorticoides ou androgênios (Claasen-van der Grinten *et al.*, 2021).

Um estudo sueco avaliou portadores de HAC-21OH e encontrou maior frequência de hipertensão, dislipidemia e fibrilação atrial (Falhammar *et al.*, 2015). Neste estudo, a obesidade estava aumentada em todos os subgrupos, enquanto a incidência de diabetes foi maior em mulheres portadoras da forma virilizante simples e forma não clássica e naqueles com mais de 40 anos de idade. Diabetes gestacional, um conhecido fator de risco para desenvolvimento de diabetes mellitus

tipo 2, apresenta maior incidência em pacientes com a forma não clássica HAC-21OH (Hirschberg *et al.*, 2021).

Dados sobre eventos cardiovasculares em HAC-21OH ainda são escassos, mas aumento da mortalidade cardiovascular foi observado em um estudo na Suécia com HAC-21OH, ficando atrás apenas da morte por crise adrenal (Falhammar *et al.*, 2014). Borges e colaboradores avaliaram a função miocárdica e gordura epicárdica por meio de ultrassom em 20 pacientes com a forma clássica da HAC-21OH (cinco homens e 15 mulheres), encontrando maior diâmetro de ventrículo esquerdo ao final da diástole nas pacientes do sexo feminino em comparação aos controles (Borges *et al.*, 2021).

Dessa forma, o monitoramento regular da dose de glicocorticoide, intervenções no estilo de vida, cuidados com ganho de peso, prevenção de obesidade, avaliação de diabetes, especialmente diabetes gestacional, e dislipidemia são necessários (Claasen-van der Grinten *et al.*, 2021), bem como melhor compreensão do papel do excesso de androgênios adrenais, do uso prolongado de glicocorticoides e de fatores genéticos, como polimorfismos nos receptores de glicocorticoide (Moreira *et al.*, 2012).

1.7 Resistência insulínica e métodos de avaliação

A resistência à insulina é uma condição fisiopatológica complexa presente em diversas alterações metabólicas, como diabetes mellitus tipo 2 e síndrome metabólica, e está inversamente relacionada com a sensibilidade à insulina em tecidos insulino-dependentes, nos quais a utilização de glicose como substrato é a via metabólica preferencial (Yaribeygi *et al.*, 2019).

A resistência à insulina apresenta forte relação com intolerância à glicose, dislipidemia e aumento dos níveis pressóricos, e desempenha um papel importante no desenvolvimento da aterosclerose e no risco de doenças cardiovasculares (DeFronzo; Tobin; Andres, 1979; Ferrannini; Mari, 1998).

A técnica padrão ouro para avaliação da sensibilidade à insulina é o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico (CEH). Nesse teste, a infusão constante de insulina propicia níveis séricos estáveis desse hormônio, inibindo a produção hepática de glicose, ao passo que a glicemia é mantida próximo aos níveis basais iniciais por meio de infusão de glicose. Desse modo, ao atingir a estabilidade (*steady state*), a

taxa de infusão de glicose se assemelha ao montante de glicose consumida, permitindo a quantificação da sensibilidade à insulina (DeFronzo; Tobin; Andres, 1979).

Quando o objetivo é avaliar a secreção de insulina, o método mais recomendado é o *clamp* hiperglicêmico. Quando as células betapancreáticas são expostas à hiperglicemia, respondem com um padrão bifásico de secreção de insulina: uma fase de início imediato e duração de cerca de 10 minutos seguida de um aumento progressivo. A avaliação das respostas precoces e tardias da secreção à insulina é utilizada para estudos de avaliação de condições predisponentes ao diabetes mellitus e para estimar o efeito pancreático de medicações e hormônios (DeFronzo; Tobin; Andres, 1979; Ferranini, 1998).

Um estudo analisou o efeito da pioglitazona na sensibilidade à insulina em um grupo de 12 pacientes adultos com HAC-21OH, utilizando o CEH. Nesse estudo, observou-se que os pacientes apresentavam menor sensibilidade à insulina em comparação ao grupo controle e que houve melhora após 16 semanas de pioglitazona. Apenas um paciente do grupo avaliado era portador da forma não clássica (Kroese *et al.*, 2009). Em um estudo brasileiro muito recente, a resistência à insulina foi demonstrada em um grupo de pacientes com a forma clássica da HAC-21OH por meio de *clamp* hiperglicêmico, inclusive em pacientes não obesos (Oliveira *et al.*, 2021).

1.8 Obesidade, adipocinas e inflamação

O tecido adiposo apresenta uma complexa composição celular, com adipócitos, células-tronco mesenquimais, células estromais, endoteliais e imunes e, em condições fisiológicas, conecta o metabolismo energético com o *status* nutricional, serve de reserva energética e proteção mecânica de alguns órgãos. Com o aumento de peso e obesidade, mudanças nos estímulos celulares levam a baixos graus de inflamação sistêmica, resistência à insulina e alterações metabólicas (Favaretto *et al.*, 2021).

As chamadas adipocinas são produzidas no tecido adiposo e contribuem para a homeostase energética e vascular por meio de ação autócrina, parácrina e endócrina (Maury; Bichard, 2010). A avaliação da função endócrina e metabólica dos adipócitos hipertrofiados na obesidade demonstra alterações no padrão de

secreção das adipocitocinas, com efeitos pró-fibróticos e pró-inflamatórios (Liu *et al.*, 2020).

A leptina é um peptídeo produzido no tecido adiposo e que participa da regulação energética, sinalizando estoques energéticos e aumentando peptídeos anorexígenos no hipotálamo. Em pacientes com obesidade, é comum que ocorra aumento dos níveis de leptina, acompanhado de resistência à sua ação, o que pode resultar em estoques ectópicos de lipídios e consequente piora da sensibilidade à insulina (Maury; Bichard, 2010).

Já a adiponectina exibe efeito antiinflamatório, antiaterogênico e cardioprotetor, por aumentar a oxidação de ácidos graxos e inibir mediadores inflamatórios e moléculas de adesão endotelial (Lecke; Morsch; Spritzer, 2011), apresentando correlação inversa com o IMC. Encontra-se reduzida em pacientes com obesidade. Tal achado é relacionado a aterosclerose precoce, hipertensão e risco de diabetes mellitus tipo 2 (Maury; Bichard, 2010; Wong; Tse, 2021).

O fator de necrose tumoral-alfa (do inglês, *tumor necrosis fator-alfa*; TNF-alfa) é reconhecido por seu papel na imunidade inata e adaptativa, e a observação de maior produção desse marcador no tecido adiposo em modelos obesos na década de 60 levou a estudos futuros que demonstraram efeito desse marcador na inibição da ação da insulina (Sethi; Hotamisligi, 2021).

A interleucina-6 (IL-6) também é uma adipocina com efeito pró-inflamatório e de resistência à insulina encontrada em pacientes com obesidade e que se relaciona com aterogênese (Maury; Bichard, 2010).

1.9 Avaliação de composição corporal

A distribuição da gordura corporal é um fator de risco mais importante para complicações associadas à obesidade do que a adiposidade por si só. O depósito visceral *versus* subcutâneo não apenas varia em termos de capacidade metabólica, mas também em relação à secreção de adipocinas (Maury; Bichard, 2010).

Diversos métodos de avaliação da composição corporal são disponíveis, entre eles a avaliação por dupla emissão de raio-X (DXA). Essa avaliação divide o corpo em três compartimentos: massa gorda (MG), conteúdo mineral ósseo e massa magra não óssea (MM), que podem ser analisados no corpo total e regionalmente. Esse é um método reprodutível, rápido, com baixa exposição à

radiação, baixo custo e boa acurácia e, por esse motivo, é considerada o padrão ouro (Bazzocchi *et al.*, 2016).

A avaliação da MG androide-ginecoide e a da gordura androide são análogas às medidas antropométricas da relação cintura-quadril e circunferência abdominal (CA), respectivamente, sendo correlacionadas com dislipidemia e resistência à insulina (Karpe; Pinnick, 2015), e a presença de MG total ou a relação MG/MM total aumentada estão associadas a maior risco de desenvolvimento de doenças cardiometabólicas (Shea *et al.*, 2012).

1.10 Justificativa da pesquisa

Nos últimos anos, o diagnóstico de HAC-21OH evoluiu, tanto pela maior disponibilidade do diagnóstico laboratorial, incluindo o teste de rastreamento neonatal, como também pela introdução do estudo molecular complementar. Adicionalmente, o manejo desses pacientes em longo prazo com glicocorticoides representa um grande desafio em relação à manutenção do controle hormonal adequado com a menor incidência possível de efeitos adversos dos glicocorticoides, como obesidade, hipertensão arterial, diabetes e baixa massa óssea.

Tanto o excesso de andrógenos quanto o tratamento crônico de glicocorticoide em doses suprafisiológicas podem contribuir para alterações no metabolismo da glicose e resistência à insulina (Paula *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2010; Tamhane *et al.*, 2018; Paizoni *et al.*, 2020). Estudos têm demonstrado aumento da resistência à insulina em pacientes com a forma clássica da HAC-21OH. Porém são escassos os dados de sensibilidade insulínica nessa população pelo método do *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico (Kroese *et al.*, 2009; Seraphim *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2021), e apenas um estudo incluiu um paciente com a forma não clássica da doença (Kroese *et al.*, 2009).

Não está definido, até o momento, se pacientes portadores da forma não clássica da HAC-21OH apresentam maior risco cardiovascular e se existe correlação do genótipo com o risco cardiometabólico e com os efeitos colaterais do tratamento em longo prazo com corticosteroides (Han *et al.*, 2013). Os poucos estudos de risco cardiovascular realizados na HAC-21OH não correlacionaram

esses fatores de risco com o genótipo e estudaram principalmente a forma clássica da doença (Harrington *et al.*, 2012; Sartorato *et al.*, 2007; Ariyawatkul *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2015; Kroes *et al.*, 2009). Ressalta-se que ainda há poucos estudos de avaliação dos fatores de risco cardiometabólico e, principalmente, faltam estudos de correlação do genótipo com esses fatores de risco na forma não clássica da HAC-21OH.

1.11 Hipótese

Com base nos pressupostos clínicos conhecidos, este estudo se pauta na seguinte hipótese: existe aumento de risco cardiometabólico na forma não clássica da Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência de 21-hidroxilase (HAC-21OH) e há correlação do risco cardiometabólico com os diferentes genótipos da forma não clássica HAC-21OH.

2. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar crianças, adolescentes e adultos portadores da forma não clássica da HAC-21OH quanto aos valores de 17OHP e androgênios ao diagnóstico, correlacionando com o genótipo, e quanto à presença de fatores de risco cardiometabólico, comparados a um grupo controle.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar as manifestações clínicas, níveis de 17OHP e androgênios no diagnóstico da forma não clássica da HAC-21OH e correlacionar com o genótipo;
- Avaliar medidas antropométricas, da pressão arterial sistêmica nos pacientes e controles sadios;
- Analisar o metabolismo lipídico (colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol e triglicerídeos) e da glicose (glicemia de jejum, hemoglobina glicada e insulina), bem como os níveis de adiponectina, leptina, IL-6 e TNF-alfa entre o grupo de pacientes e o grupo controle;
- Avaliar a espessura da camada mediointimal das artérias carótidas por ultrassom e composição corporal por DXA;
- Avaliar a sensibilidade tecidual à insulina pela técnica do *Clamp* Euglicêmico-Hiperinsulinêmico nos grupos de pacientes e controles;
- Comparar a sensibilidade à insulina entre pacientes e controles, entre os genótipos e a correlação com o tratamento dos pacientes com HAC NC em relação aos controles.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Trata-se de pesquisa observacional com análise retrospectiva dos dados ao diagnóstico, somada à análise prospectiva transversal de fatores de risco cardiometabólico dos pacientes da forma não clássica da HAC-21OH acompanhados no ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP).

3.2 Aspectos éticos

A pesquisa foi autorizada pelo Departamento de Clínica Médica e Chefia do Ambulatório e Laboratório de Endocrinologia do HC-FMRP-USP (Anexo 3) e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HC-FMRP-USP em 09/10/2018, protocolo de número 2.951.304/2018 (Anexo 4).

Os participantes foram informados sobre os riscos e benefícios do estudo. Os adultos portadores de NC-HAC-21OH assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Apêndice 2); as crianças e adolescentes assinaram o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (Tale – Apêndice 3) e seus responsáveis, o respectivo TCLE (Apêndice 4). O grupo controle também assinou o TCLE e o Tale (Apêndices 5, 6 e 7).

Este estudo recebeu financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp - Processo nº 2018/10789-4) e da Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Faepa – Processo nº 1.083/2018).

3.3 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo todos os pacientes portadores da forma não clássica da HAC-21OH acompanhados no Ambulatório de Endocrinologia do HC-FMRP-USP.

Foram excluídos pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1 ou tipo 2 em tratamento, hepatopatia crônica, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor grave e aqueles em uso de medicamentos que influenciam o metabolismo da glicose, exceto os pacientes que estavam em tratamento da HAC-21OH com glicocorticoides e pacientes que estavam em uso de anticoncepcional oral.

3.4 População e amostra

Para o presente estudo, foram considerados todos os pacientes com diagnóstico de HAC-21OH forma não clássica em acompanhamento no ambulatório de Endocrinologia do HC-FMRP-USP. Entre os pacientes 72 pacientes iniciais, 30 concordaram em participar, 18 tiveram perda de seguimento, 15 recusaram a participação na pesquisa e nove se enquadraram nos critérios de exclusão: diabetes tipo 2 (n=4), doença hepática (n=2), disfunção cognitiva (n=1) e óbito (n=2).

O diagnóstico de HAC-21OH forma não clássica foi confirmado por dosagem de 17OHP basal e após ACTH (Cosytropin ACTH 1-24, Synacthen®, Novartis, Australia), conforme diretrizes atuais (Speiser *et al.*, 2018).

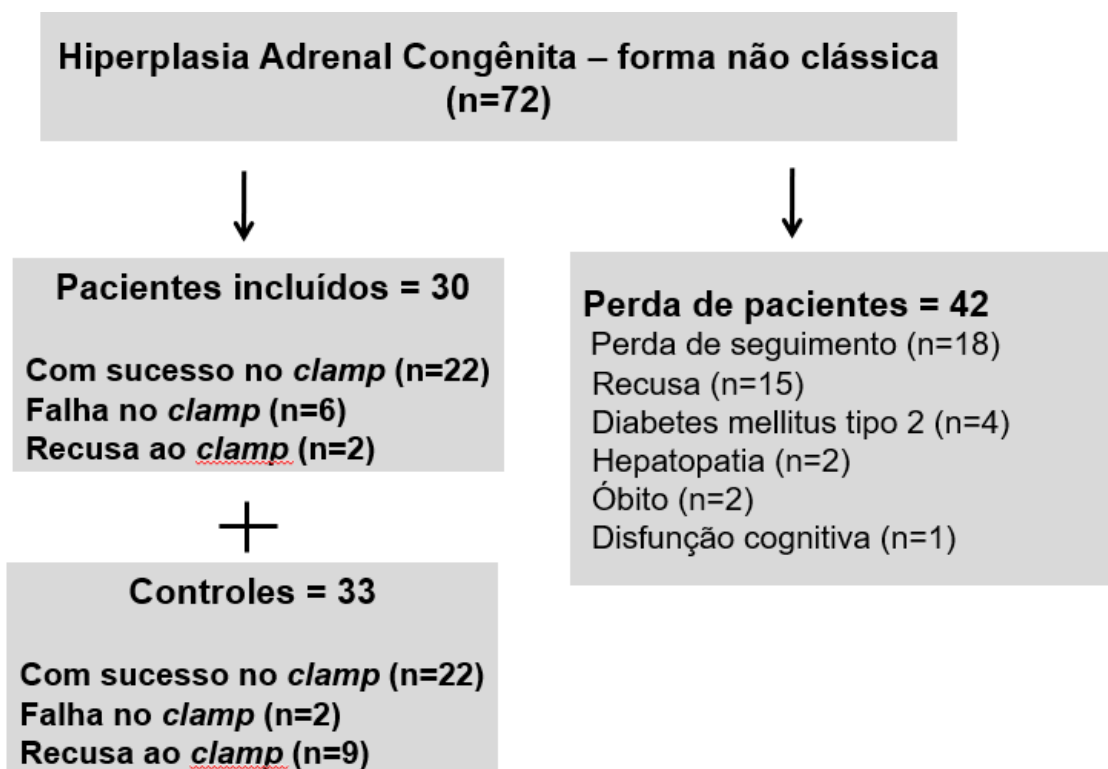
O grupo de pacientes foi dividido de acordo com o diagnóstico molecular em: mutação não clássica/não clássica (NC/NC), em que ambos os alelos apresentam mutação leve; e portadores de mutação clássica/não clássica (C/NC), em que um dos alelos apresenta pequena atividade enzimática (mutação moderada ou grave) e o outro alelo apresenta mutação leve.

A seleção de indivíduos para o grupo controle foi feita por meio de divulgação de panfletos, cartazes e e-mail pelo setor de Imprensa do HC-FMRP-USP após avaliação das características dos portadores da condição clínica. O grupo foi composto de pessoas que não apresentam HAC-21OH, hepatopatia crônica, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor grave, diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2 em tratamento, hipertensão arterial, evento cardiovascular prévio (infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico) ou uso de medicações que influenciam o metabolismo da glicose, exceto uso de anticoncepcional oral em mulheres.

Os participantes do grupo controle foram pareados àqueles com a condição clínica por sexo, idade e IMC.

A Figura 3 mostra o fluxograma da seleção de participantes.

Figura 3 – Fluxograma dos participantes selecionados



Fonte: a autora.

3.5 Coleta de dados

A coleta de dados aqui apresentada foi realizada no período de outubro de 2018 a julho de 2021.

3.5.1 Análise retrospectiva

Os prontuários médicos foram avaliados para extração das seguintes variáveis presentes ao diagnóstico: sexo, idade, manifestações clínicas de hiperandrogenismo, dose e duração do tratamento com glicocorticoides, valores de 17OHP, testosterona total, androstenediona e DHEAS, idade óssea, laudo do diagnóstico molecular para o gene da enzima 21OH, tratamento recebido e duração.

A dose de glicocorticoide foi expressa em equivalente de hidrocortisona por m² de superfície corporal. Para conversão, utilizou-se a potência glicocorticoide relativa, conforme previamente descrito (Parente, 2017).

A análise molecular do gene *CYP21A2* foi realizada conforme descrito em trabalhos prévios do nosso grupo. A análise foi realizada por reação da polimerase em cadeia alelo específica (ASO-PCR) para a detecção das mutações em ponto mais frequentes, pela reação de MLPA (*Multiplex Ligation dependent Probe Amplification*, do inglês) para a detecção de grandes rearranjos gênicos e por sequenciamento automático do gene *CYP21A2* para a pesquisa de mutações raras (Coeli-Lachinni *et al.*, 2013).

3.5.2 Análise prospectiva

3.5.2.1 Avaliação clínica

A avaliação foi realizada na Enfermaria da Endocrinologia e na Unidade de Pesquisa Clínica do HC-FMRP-USP e registrada em formulário próprio (Apêndice 1). Os parâmetros avaliados foram: sintomas, histórico de saúde e medicações em uso, peso, altura, cálculo de IMC, medida de circunferências do abdome, quadril e pressão arterial sistêmica.

O peso corporal foi medido com roupas leves, sem acessórios, em balança digital Filizola® do tipo plataforma, previamente calibrada. O resultado foi anotado em quilogramas e com uma casa decimal após a vírgula. A estatura foi medida em estadiômetro de parede com o paciente descalço, em pé, posicionado ao centro do equipamento, com braços estendidos ao longo do corpo. O resultado foi anotado em centímetros. Com os dados obtidos de peso e estatura, procedeu-se ao cálculo do IMC, em kg/m². Os valores de IMC em crianças e adolescentes até 19 anos foram determinados por meio da análise de percentil, conforme curvas populacionais da Organização Mundial de Saúde, sendo classificados com sobrepeso (percentil > 85 e ≤ 97) ou obesidade (percentil > 97) (Sociedade Brasileira de Pediatria - SBP, 2019), enquanto os adultos foram classificados de acordo com o IMC em: eutróficos se IMC 18,5-24,9 kg/m²; sobrepeso se IMC 25-29,9 kg/m² e obesos se IMC > 30 kg/m² (Associação Brasileira para o estudo da obesidade e da Síndrome Metabólica - Abeso, 2016).

As circunferências abdominal (CA) e do quadril foram avaliadas em ortostase, com fita métrica, pela pesquisadora. A medida da CA foi realizada no ponto médio entre cicatriz umbilical e crista ilíaca anterossuperior e a medida do quadril foi realizada na linha dos trocanteres maiores do fêmur. Os resultados foram anotados em centímetros, sendo considerada uma casa decimal após a vírgula, quando necessário. Na população brasileira adulta, considera-se aumento da CA ≥ 80 cm em mulheres e ≥ 90 cm em homens (Abeso, 2016), enquanto para crianças, valores acima do percentil 90 para idade e sexo foram considerados aumentados (SBP, 2019). Os valores obtidos na medida do quadril foram utilizados para cálculo da relação cintura-quadril, sendo considerados alterados valores acima de 0,9 para homens e 0,85 para mulheres (Souza *et al.*, 2015). Outra avaliação antropométrica realizada foi a relação cintura-estatura, com valores normais abaixo de 0,5 em adultos (Abeso, 2016; SBP, 2019).

A pressão arterial foi avaliada com esfigmomanômetro digital Microlife[®], com os indivíduos em decúbito dorsal e em repouso por cinco minutos. Foram realizadas três medidas no membro superior direito e no esquerdo, e posteriormente foi calculada a média das medidas da pressão arterial sistólica e diastólica. Todos os participantes possuíam circunferência do braço entre 18-35 cm, sendo utilizado manguito apropriado para tal aferição. Para definição de pressão arterial elevada e hipertensão arterial foram utilizados os critérios definidos pelas Diretrizes Brasileiras de Hipertensão 2020, para crianças, adolescentes e adultos (Barroso *et al.*, 2021).

3.5.2.2 Bioimpedância

A composição corporal foi estimada por bioimpedância elétrica com aparelho tetrapolar Biodynamics BIA310[®], para posterior ajuste dos resultados do CEH para a massa magra. Os pacientes encontravam-se em jejum de aproximadamente 10 horas e, ainda em decúbito dorsal, era realizada fixação dos eletrodos no membro superior direito – região distal do antebraço e proximal da mão, e membro inferior direito – região distal da perna e proximal do pé. A partir da aplicação da corrente elétrica, foram obtidas as medidas de massa magra (kg) e massa gorda (kg) emitidos pelo aparelho.

3.5.2.3 Exames laboratoriais

Posteriormente à avaliação clínica descrita acima, os pacientes foram submetidos à coleta de sangue venoso para análises laboratoriais, ainda em jejum. As amostras foram coletadas após punção venosa periférica com Abocath® 22, e acondicionadas em gelo até o término dos exames. A partir das amostras, foram avaliados: glicemia de jejum, hemoglobina glicada, lipidograma com jejum, insulina basal, proteína C reativa ultrasensível (PCRus), IL-6, TNF-alfa, leptina, adiponectina.

Todas as amostras foram coletadas em tubos BD Vacutainer® (BD Medical, New Jersey, USA), próprios para separação de plasma ou soro. As dosagens de glicemia, hemoglobina glicada e lipidograma foram processados imediatamente após o término da avaliação. O material para realização dos demais exames foi centrifugado e acondicionado a -20°C em refrigerador pela pesquisadora, no laboratório de Endocrinologia do HCFMRP-USP, para posterior dosagem.

As concentrações séricas de 17OHP, androstenediona e testosterona total foram determinadas por radioimunoensaio (RIA) seguindo a técnica padronizada no Laboratório de Endocrinologia do HC-FMRP-USP, que utiliza extração prévia do plasma com éter etílico (Vieira *et al.*, 1981). Os resultados são expressos em ng/dL e valores inferiores a 200 ng/dL são considerados normais (Speizer *et al.*, 2018). As concentrações séricas de DHEAS, testosterona total e androstenediona foram determinados por RIA segundo a técnica descrita por Vieira e *cols* (Vieira *et al.*, 1980), que não utiliza extração ou cromatografia prévia, e os resultados foram expressos em mcg/dL, ng/dL e ng/dL, respectivamente. Os valores de referência para androstenediona são: menor de 80 ng/dL em pré-púberes e abaixo de 250 ng/dL em pós-púberes. Para testosterona, valores inferiores a 20 ng/dL são considerados normais na idade pré-puberal e abaixo de 80 ng/dL em mulheres adultas. Valores normais de DHEAS em pacientes com idade pré-puberal e pós-puberal são, respectivamente, 5 a 60 e 80 a 300 mcg/dL (Moreira; Elias, 1992; Mermejo *et al.*, 2005).

O cortisol plasmático foi obtido por método de RIA sem extração prévia do plasma e os resultados foram expressos em mcg/dL. Os valores normais variam de 5 a 18 mcg/dL (Vieira *et al.*, 1979).

A glicemia, colesterol total (CT), HDL-colesterol e triglicerídeos (TG) foram realizados em aparelho Atellica CH[®] Analyzer, Siemens Healthineers, Erlangen, Alemanha. O LDL- colesterol foi obtido por meio de cálculo, pela fórmula de Friedewald, a saber: $[LDL] = (CT - HDL) - (TG/5)$. Os resultados são expressos em mg/dL. Para glicemia, valores abaixo de 100 mg/dL são considerados normais. Para adultos, valores de CT < 190 mg/dL; HDL > 40 mg/dL; TG < 150 mg/dL foram considerados normais (Faludi *et al.*, 2017). Para crianças e adolescentes de 2 a 19 anos, os valores normais são: CT < 170 mg/dL; HDL > 45 mg/dL; TG < 75 mg/dL (2-9 anos) e < 90 mg/dL (10-19 anos) (Alves *et al.*, 2020).

Para a dosagem de hemoglobina glicada (HbA1C), utilizou-se Cromatografia Líquida de Alta eficiência (Bio-Rad Laboratories, Inc Hercules, CA, USA). O resultado foi expresso em porcentagem (%) e os valores normais de HbA1C são inferiores a 5,7%.

A PCRus foi determinada por quimioluminescência (IMMULITE[®]2000, Siemens Healthcare Diagnostics, Los Angeles, CA, USA) e os resultados expressos em mg/dL. São considerados de baixo risco cardiovascular aqueles com PCRus abaixo de 1mg/dL; risco intermediário: valores entre 1-3 mg/dL; e alto risco pacientes com PCRus acima de 3mg/dL, na ausência de outras doenças inflamatórias agudas ou infecções (Myers *et al.*, 2004). A insulina foi avaliada por radioimunoensaio (IMMULITE[®]2000, Siemens Healthcare Diagnostics, Los Angeles, CA, USA) e expressa em μ UI/mL. Os valores de insulina foram utilizados para cálculo do índice HOMA-IR e não foram analisados isoladamente.

A dosagem de IL-6 (pg/mL), TNF-alfa (pg/mL), leptina (ng/mL) e adiponectina (μ g/mL) foi realizada por teste imuno enzimático magnético multiparamétrico Milliplex[®] (Merck Millipore, Texas, USA). Entre parênteses estão definidas as respectivas unidades de medida.

3.5.2.4 Ultrassom de artérias carótidas

A análise da espessura da CMI das artérias carótidas foi realizada por meio de ultrassom EPIQ 7[®] (Philips Healthcare, Cambridge, MA, USA), com operador experiente e que desconhecia os demais achados da pesquisa. Para cada participante, foram realizadas duas medidas de CMI bilateralmente, na porção

distal das artérias carótidas comuns, distando 1cm da bifurcação carotídea e em plano longitudinal. O *software* realizava a segmentação automática da CMI e a medida era obtida em 1cm de comprimento. O resultado foi expresso em mm. O valor de CMI acima de 0,9 mm foi considerado para aterosclerose (Williams *et al.*, 2018).

3.5.2.5 Composição corporal por dupla emissão de raios-X (DXA)

A composição corporal foi avaliada utilizando-se o aparelho Hologic QDR® 4500A scanner, (Hologic Inc., Waltham, MA, USA) com obtenção de dados de massa muscular e massa de gordura, em kg. Os valores obtidos foram analisados de acordo com a referência para idade e sexo (Hinton *et al.*, 2017).

3.5.2.6 Sensibilidade e resistência à insulina

Para avaliação da sensibilidade e resistência à insulina, foi utilizado HOMA-IR (do inglês, *Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance Index*) e CEH, respectivamente.

3.5.2.6.1 HOMA-IR

Com os resultados da glicemia de jejum e insulina basal, foi calculado o HOMA-IR de cada participante do estudo, conforme a seguinte fórmula (DeFronzo; Tobin; Andres, 1979):

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Glicemia de Jejum (mmol/L)} \times \text{Insulina Basal } (\mu\text{U/mL})}{22,5}$$

O índice é considerado normal quando abaixo de 2,71 (Geloneze *et al.*, 2009).

3.5.2.6.2 *Clamp* Euglicêmico-Hiperinsulinêmico

Para a realização do *clamp*, os participantes foram submetidos a duas punções venosas: uma no membro superior direito, que estava envolto por uma

manta térmica visando atingir cerca de 40°C a fim de aumentar o fluxo arteriovenoso durante o procedimento, padronizado para coletas e medidas de glicosimetria; e outro acesso era obtido no lado esquerdo para infusão de solução de insulina e glicose.

Para preparo da solução de insulina e medida da taxa de infusão de glicose (do inglês, *glucose infusion rate – GIR*), utilizaram-se o peso e a altura obtidos previamente para cálculo da superfície corporal, e, por meio de programa específico e fórmula já validada (Ferrannini; Mari, 1998), foi obtida a quantidade de insulina regular Humulin R®, EliLilly, a ser adicionada à diluição padrão de soro fisiológico 0,9% (46ml) e sangue do paciente (4ml). A infusão da solução com insulina foi fixada para todos os participantes e era maior nos minutos iniciais, com a finalidade de aumentar a concentração sérica de insulina e manter este platô estável ao longo do teste (alvo de insulina plasmática de 600 pmol/L). Nos tempos subsequentes, a infusão foi mantida em 120 mU/m².min, valor considerado suficiente para inibir a produção hepática de glicose.

Em bomba de infusão separada, foi acoplada solução de glicose a 10% e iniciada infusão conforme cálculo de 1,0 GIR. Medidas de glicosimetria eram realizadas com aparelho Accu-Check Active®, Roche Diagnostics, a cada 5 minutos e, se necessário, a taxa de infusão de glicose era ajustada em intervalo menor de 1 minuto após a medida, a fim de evitar variação da glicemia acima de 10% do valor inicial do teste. Dessa forma, a taxa de infusão de insulina era mantida constante enquanto a velocidade de infusão de glicose variava, com o intuito de manter a glicemia estável durante o teste. A taxa de infusão de glicose durante o período de platô é diretamente relacionada à sensibilidade tecidual à insulina (DeFronzo; Tobin; Andres, 1979; Ferrannini; Mari, 1998, Tagi; Giannini; Chiarelli, 2019). Ao término, o participante recebia uma refeição e ficava em observação por 30 minutos.

Para a análise dos resultados, foi calculado o valor da glicose metabolizada (M) durante os tempos 80-120 minutos do *clamp* (período de platô), considerando o valor de GIR e corrigindo para massa magra (M/mm), sendo expresso em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$.

O teste foi realizado conforme protocolo do HC-FMRP-USP (Anexo 1). Os registros foram feitos em formulário específico para CEH do serviço de Endocrinologia do HC-FMRP-USP (Anexo 2).

3.6 Processamento e análise dos dados

Após a coleta manual das informações e de resultados de exames, os dados foram tabulados em planilhas eletrônicas (Excel[®] 2016) para posterior análise estatística descritiva e inferencial. As variáveis com distribuição normal foram expressas em média \pm desvio-padrão e as variáveis com distribuição não normal foram expressas em mediana e intervalo interquartil.

As comparações entre os grupos foram realizadas por teste Mann-Whitney ou teste Kruskal-Wallis para variáveis múltiplas (pós-teste de Dunn), quando apropriado. Variáveis categóricas foram comparadas por meio do Teste Exato de Fisher. A correlação de Spearman foi utilizada para avaliar relação. Os dados foram analisados no programa GraphPad PRISM 8[®], Inc., 2020, e o valor de $P \leq 0,05$ foi considerado como significativo.

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

Participaram do estudo 30 pacientes portadores da forma não clássica de HAC-21OH (25 do sexo feminino e cinco do sexo masculino) e 33 controles saudáveis (28 do sexo feminino e cinco do sexo masculino).

Na Tabela 1, estão as manifestações clínicas do diagnóstico, genótipo e tratamento dos pacientes com a forma NC-HAC-21OH. Dezoito de 30 pacientes foram diagnosticadas durante a infância com uma idade média de $7,3 \pm 2,2$ anos, apresentando como manifestações: pubarca precoce (88%), avanço de idade óssea (55%) e clitoromegalia (33%). Entre os 12 pacientes com manifestações na adolescência e fase adulta, as manifestações clínicas que levaram ao diagnóstico foram: Irregularidade menstrual (58%), hirsutismo (50%), infertilidade (16%), acne (16%) e clitoromegalia (25%).

Todos os 30 pacientes foram tratados previamente com glicocorticoide. Ao diagnóstico, as crianças foram tratadas com acetato de cortisona e os adultos foram tratados com dexametasona. Durante o seguimento, 35% dos adultos descontinuaram o tratamento porque estavam assintomáticos.

Entre as 25 mulheres com NC-HAC-21OH, nove estavam em uso de contraceptivo oral combinado, duas com progestágeno oral e uma com anel vaginal. Dos 22 controles do sexo feminino, quatro usavam contraceptivo oral combinado, dois progestágeno oral, dois com dispositivo intrauterino não hormonal, um com dispositivo intrauterino com levonorgestrel e um com implante subcutâneo de etonogestrel.

Tabela 1 – Manifestações clínicas, genótipo e tratamento dos pacientes portadores da forma não clássica de HAC-21OH

| | Sexo | Idade atual (anos) | Idade inicial (anos) | Manifestações clínicas | Genótipo | Tratamento inicial | Tratamento atual |
|---|------|--------------------|----------------------|---|-------------------|--------------------|-------------------|
| 1 | F | 31 | 7,2 | PP (6a), acne, avanço IO | R356W/V281L | Cortisona 12,5mg | Dexa 0,25/0,125mg |
| 2 | F | 44 | 35 | Amenorreia secundária, clitoromegalia (1,8cm) | P30L/IVS2-13A/C>G | Prednisona 5mg | - |
| 3 | F | 31 | 26 | Hirsutismo | V281L/CI6 | Dexa 0,25mg | Dexa 0,25mg |

| | | | | | | | |
|----|---|----|-----|---|--------------------|-------------------|-------------------|
| 4 | F | 48 | 36 | Hirsutismo, irreg. menstrual, clitoromegalia (1,4cm) | V281L/I172N | Dexa 0,25 mg | Dexa 0,25/0,125mg |
| 5 | F | 38 | 32 | Hirsutismo, irreg. menstrual, clitoromegalia (2,2cm), infertilidade | P30L/IVS2-13A/C>G | Dexa 0,5mg | Dexa 0,25 mg |
| 6 | F | 23 | 18 | PP (5a), acne | V281L/IVS2-13A/C>G | Dexa 0,25mg | Dexa 0,25 mg |
| 7 | F | 15 | 5 | PP (5a), acne, avanço IO | I172N/V281L | Cortisona 12,5mg | Cortisona 25mg |
| 8 | M | 16 | 8,9 | PP (5a), avanço IO | del8/V281L | Cortisona 18,75mg | - |
| 9 | F | 32 | 16 | Hirsutismo, irreg. menstrual, acne | V281L/ Q318X | Cortisona 25mg | - |
| 10 | F | 32 | 5,5 | PP (5a) | R356W/V281L | Cortisona 25mg | Dexa 0,25/0,125mg |
| 11 | F | 20 | 15 | Amenorreia primária | I172N/V281L | Dexa 0,25mg | Dexa 0,125 mg |
| 12 | F | 10 | 8,2 | PP (5a), acne, avanço IO | V281L/IVS2-13A/C>G | Cortisona 12,5mg | Cortisona 12,5mg |
| 13 | F | 34 | 26 | Hirsutismo, infertilidade | del8+P30L/V281L | Prednisona 5mg | Dexa 0,25 mg |
| 14 | M | 28 | 9,6 | PP (8a), avanço IO | V281L/V281L | Cortisona 25mg | - |
| 15 | F | 23 | 15 | Irreg. menstrual, acne | V281L/V281L | Dexa 0,125mg | Dexa 0,25 mg |
| 16 | F | 24 | 6,7 | PP (6a) | V281L/V281L | Cortisona 12,5mg | Dexa 0,25 mg |
| 17 | F | 22 | 16 | Hirsutismo, acne, irreg. menstrual | V281L/A265V | Dexa 0,25mg | Dexa 0,5 mg |
| 18 | F | 15 | 6,7 | PP (6a) | V281L/A265V | Cortisona 12,5mg | Dexa 0,5 mg |
| 19 | M | 12 | 7,5 | PP (7a), avanço IO | V281L/V281L | Cortisona 12,5mg | - |
| 20 | F | 34 | 8 | PP (7a) | V281L/V281L | Cortisona 25mg | - |
| 21 | F | 28 | 9,6 | PP (7a), avanço IO | V281L/V281L | Cortisona 18,75mg | - |
| 22 | F | 14 | 8 | PP (6,5a), avanço IO | V281L/V281L | Cortisona 25mg | - |
| 23 | F | 10 | 8 | PP (7a) | V281L/V281L | Cortisona 18,75mg | Cortisona 18,75mg |
| 24 | F | 10 | 6,6 | PP (6a), avanço IO | V281L/V281L | Cortisona 12,5mg | Cortisona 18,75mg |
| 25 | F | 23 | 6 | PP (5a) | V281L/P453S | Cortisona 25mg | Dexa 0,5mg |
| 26 | F | 24 | 1,4 | Clitoromegalia (1,3cm) | V281L/L446P | Cortisona 12,5mg | - |
| 27 | M | 13 | 8 | PP (8a), avanço IO | V281L /V281L | Cortisona 12,5mg | Cortisona 6,25mg |

| | | | | | | | |
|----|---|----|----|-----------------------------------|--------------|------------------|------------------|
| 28 | M | 32 | 12 | Puberdade rapidamente progressiva | V281L /V281L | Cortisona 12,5mg | - |
| 29 | F | 32 | 12 | Hirsutismo, acne | - | Prednisona 5mg | Prednisona 2,5mg |
| 30 | F | 14 | 7 | PP (7a), clitoromegalia (1cm) | - | Cortisona 6,25mg | Cortisona 25mg |

PP: pubarca precoce (idade de apresentação entre parênteses). IO: idade óssea. Irreg. menstrual: irregularidade menstrual (oligomenorreia ou amenorreia). Clitoromegalia (tamanho entre parênteses). Dexametasona. Cortisona: acetato de cortisona.
Fonte: a autora.

A mutação mais frequentemente encontrada foi a p.V281L (66% dos alelos), sendo 39% em homozigose (p.V281L/p.V281L) e 7% em heterozigose composta para p.V281L e p.A265V, p.L446P ou p.P453S (genótipo NC/NC). Os demais pacientes foram heterozigotos compostos para um alelo da forma clássica e um alelo para a forma não clássica (genótipo C/NC) e as variantes alélicas associadas com a forma clássica (C/NC) foram: p.I172N, IVS2-13A/C>G, Δ8, CL6, p.Q318X e p.R356W.

Nas tabelas 2, 3 e 4, estão dispostas as características dos portadores de NC-HAC-21OH separados por genótipo e por manifestações ao diagnóstico (pré ou pós-puberal).

Tabela 2 – Características dos pacientes portadores da forma não clássica de HAC-21OH separados por genótipo

| | NC/NC | C/NC | <i>p-valor</i> |
|--------------------|------------|-------------|----------------|
| Participantes (n) | 15 | 13 | |
| Sexo F/M | 11F/4M | 12F/1M | |
| Idade atual (anos) | 20,8 ± 7,9 | 28,8 ± 11,4 | ns* |

*Teste Mann-Whitney. ns: não significativo.
Fonte: a autora.

Observa-se que o grupo de pacientes com genótipo C/NC apresentou menor idade de pubarca ($6,9 \pm 0,7$ vs $5,2 \pm 0,4$ anos, $p=0,001$). Não houve diferença quanto a frequência de pubarca precoce, clitoromegalia, presença de avanço de idade óssea ou meses de avanço de idade óssea (Tabela 3).

Tabela 3 – Manifestações clínicas pré-puberais dos pacientes portadores da forma não clássica de HAC-21OH, separados por genótipo

| | NC/NC | C/NC | <i>p</i> -valor |
|------------------------------|-----------|------------|-----------------|
| Total | 13 | 5 | |
| Sexo F/M | 9F/4M | 4F/1M | |
| Idade ao diagnóstico, anos** | 7,5 ± 2,4 | 7 ± 1,7 | ns |
| Pubarca precoce* | 11 | 5 | ns |
| Idade pubarca, anos** | 6,9 ± 0,7 | 5,2 ± 0,4 | 0,001 |
| Clitoromegalia* | 1 | 0 | ns |
| Presença de avanço IO* | 6 | 4 | ns |
| Meses de avanço IO** | 36,9 ± 11 | 40,5 ± 6,5 | ns |

*Teste exato de Fisher. **Teste de Mann Whitney. NC/NC: mutação leve/leve. C/NC: mutação leve/moderada ou grave. F/M: feminino/masculino. IO, idade óssea pelo método de Greulich-Pyle. ns: não significativo. Fonte: a autora.

Em relação ao grupo que teve diagnóstico da forma NC-HAC-21OH pós-puberal, todas as pacientes eram do sexo feminino (n=10) e não foram observadas diferenças clínicas quanto a hirsutismo, irregularidade menstrual, infertilidade, acne e clitoromegalia quando comparados os genótipos NC/NC vs C/NC (Tabela 4).

Tabela 4 – Manifestações clínicas dos pacientes portadores da forma não clássica de HAC-21OH com diagnóstico pós-puberal, separados por genótipo

| | NC/NC | C/NC | <i>p</i> -valor |
|-----------------------------|-------|------|-----------------|
| Total | 2 | 8 | |
| Idade ao diagnóstico, anos* | | | ns |
| Hirsutismo** | 1 | 5 | ns |
| Irreg. menstrual** | 2 | 5 | ns |
| Infertilidade** | 0 | 2 | ns |
| Acne** | 2 | 2 | ns |
| Clitoromegalia** | 0 | 3 | ns |

*Teste de Mann Whitney.**Teste exato de Fisher. NC/NC: mutação leve/leve. C/NC: mutação leve/moderada ou grave. Irregularidade menstrual: oligo ou amenorreia. ns: não significativo. Fonte: a autora.

Quanto ao diagnóstico laboratorial da NC-HAC-21OH, a 17OHP basal e após estímulo com ACTH, em ng/dL, nos 30 pacientes foi 1745 ± 2277 e 5065 ± 4230 ng/dL respectivamente. Ao diagnóstico, os pacientes pré-púberes apresentaram valores de androstenediona de 146 ± 93 ng/dL, testosterona 67 ± 92 ng/dL e DHEAS 130 ± 83 mcg/dL e os pós-púberes apresentaram valores de androstenediona de 448 ± 580, testosterona 124 ± 63 e DHEAS 421 ± 702 (Tabela 5).

Na Tabela 5, estão apresentados os dados laboratoriais ao diagnóstico dos pacientes separados pelo genótipo. O grupo de pacientes com genótipo C/NC apresentou valores superiores de 17OHP basal (2490 ± 2700 vs 979 ± 1252 ng/dL, $p=0,01$) e após ACTH (7152 ± 4715 vs 2769 ± 1011 ng/dL, $p=0,003$) em relação ao grupo NC/NC.

Tabela 5 – Dados laboratoriais dos pacientes portadores da forma não clássica de HAC-21OH ao diagnóstico, separados por genótipo e por idade de diagnóstico (pré ou pós-puberal)

| | NC/NC | C/NC | Ref ^{1, 2} | P-valor* |
|----------------------------|------------------|-----------------|---------------------|--------------|
| Sexo (F/M) | 11F/4M | 12F/1M | | |
| 17OHP basal (ng/dL) | 979 ± 1252 | 2490 ± 2700 | | 0,01 |
| 17OHP após ACTH (ng/dL) | 2769 ± 1011 | 7152 ± 4715 | | 0,003 |
| Diagnóstico pré-puberal | | | | |
| Androstenediona (ng/dL) | 132 ± 92 | 190 ± 97 | < 80 | ns |
| Testosterona total (ng/dL) | $71,7 \pm 103,2$ | $66 \pm 69,5$ | < 20 | ns |
| DHEAS (mcg/dL) | $126 \pm 92,6$ | $164 \pm 29,7$ | 5 a 60 | ns |
| Diagnóstico pós-puberal | | | | |
| Androstenediona (ng/dL) | 567 ± 612 | 511 ± 639 | < 250 | ns |
| Testosterona total (ng/dL) | 125 ± 39 | 131 ± 71 | <80 | ns |
| DHEAS (mcg/dL) | - | 192 ± 134 | 80-300 | ns |

*Teste exato de Fisher. NC/NC: mutação leve/leve. C/NC: mutação leve/moderada ou grave. F/M: feminino/masculino. 17OHP: 17OH progesterona. ACTH: hormônio adrenocorticotrófico. DHEAS: sulfato de deidroepiandrosterona. ns: não significativo. ¹: Elias; Moreira; 1992. ²:Mermejo et al., 2005
Fonte: a autora.

No momento do presente estudo, as médias de idade dos 30 pacientes NC-HAC-21OH e dos 33 controles foram, respectivamente, $24,4 \pm 10,3$ vs $27,9 \pm 11$ anos, $p=0,3$.

Na Tabela 6, estão expostos os dados antropométricos dos participantes adultos do estudo. Os grupos HAC-21OH e controle apresentaram peso ($70,1 \pm 20$ vs $67,8 \pm 20,1$ kg, $p=0,8$) e IMC semelhantes (27 ± 7 vs 27 ± 6 kg/m², $p=0,8$), mas o grupo de pacientes apresentou maior relação cintura-quadril em relação ao controle ($0,92 \pm 0,05$ vs $0,86 \pm 0,08$, $p=0,005$).

Tabela 6 – Características clínicas e antropométricas dos participantes adultos

| | HAC NC | Controles | *p-valor | NC/NC | C/NC | *p-valor |
|------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|----------|
| Total | 20 | 26 | | 9 | 10 | |
| Idade, anos | 30,1 ± 7,3 | 32,1 ± 7,9 | Ns | 26,4 ± 4,3 | 33,3 ± 8,5 | ns |
| Feminino, n (%) | 18 (90%) | 24 (92%) | - | 7 (78%) | 10 (100%) | - |
| IMC, kg/m ² | 27 ± 7 | 27 ± 6 | Ns | 29 ± 9 | 26 ± 5 | ns |
| CA, cm | 92,7 ± 16 | 92,6 ± 15 | Ns | 91,4 ± 14,4 | 94,4 ± 18,7 | ns |
| RCQ | 0,92 ± 0,05 | 0,86 ± 0,08 | 0,005 | 0,91 ± 0,07 | 0,92 ± 0,07 | ns |
| RCE | 0,57 ± 0,10 | 0,56 ± 0,08 | Ns | 0,56 ± 0,07 | 0,58 ± 0,12 | ns |
| PAS, mmHg | 119 ± 15 | 115 ± 10 | ns | 121 ± 11 | 118 ± 19 | ns |
| PAD, mmHg | 77 ± 9 | 74 ± 7 | ns | 78 ± 7 | 77 ± 11 | ns |

*Teste Mann-Whitney. HAC NC: Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência de 21-hidroxilase forma não clássica. NC/NC: mutação leve/leve. C/NC: mutação leve/moderada ou grave. IMC: índice de massa corporal. CA: circunferência abdominal. RCQ: relação cintura-quadril. RCE: relação cintura estatura. PAS: pressão arterial sistólica. PAD: pressão arterial diastólica.

Fonte: a autora.

Entre os adultos, 14/20 pacientes HAC-NC e 18/26 controles apresentaram circunferência abdominal acima da referência para sexo e idade (Zimmet *et al.*, 2007).

Na Tabela 7, estão expostos os dados clínicos e antropométricos de crianças e adolescentes. As crianças e adolescentes portadores de NC-HAC apresentaram pressão arterial sistólica mais elevada do que os controles ($p=0,01$). Para tal, a análise dos níveis pressóricos de acordo com idade, sexo e percentil de altura foram realizados, de acordo com os critérios das Diretrizes Brasileiras de Hipertensão de 2020 (Barroso *et al.*, 2021). Dois pacientes do grupo C/NC apresentaram alteração na pressão arterial: um com PA sistólica elevada e outro com hipertensão sistólica. No grupo NC/NC, dois pacientes apresentaram PAS elevada e um PAD elevada; um apresentou PAS elevada e hipertensão diastólica; e um paciente com hipertensão sistólica e diastólica.

As relações cintura-quadril e cintura-estatura foram maiores no grupo de pacientes em relação aos controles ($0,94 \pm 0,13$ vs $0,82 \pm 0,04$, $p=0,007$ e $0,58 \pm 0,10$ vs $0,47 \pm 0,05$, $p=0,04$ respectivamente).

Utilizando-se os critérios da Organização Mundial de Saúde para crianças, adolescentes e adultos (Onis *et al.*, 2007), os pacientes foram divididos em subgrupos por idade para classificação do peso: entre 10-14 anos, 28% apresentam sobrepeso e 57% obesidade.

Tabela 7 – Características clínicas e antropométricas dos participantes crianças e adolescentes

| | HAC NC | Controles | p-valor | NC/NC | C/NC | p-valor |
|-------------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|---------|
| n | 10 | 7 | | 6 | 3 | |
| Idade, anos* | 12,9 ± 2,3 | 12 ± 3,1 | ns | 12,3 ± 2 | 13,6 ± 3,2 | ns |
| Feminino (%) | 7 (70%) | 4 (57%) | - | 4 (67%) | 2 (66%) | - |
| PAS elevada/ hipertensão** | 7 | 0 | 0,01 | 5 | 2 | ns |
| PAD elevada/ hipertensão** | 4 | 0 | ns | 4 | 0 | ns |
| Aumento da CA** | 6 | 1 | ns | 4 | 1 | ns |
| RCQ* | 0,94 ± 0,13 | 0,82 ± 0,04 | 0,007 | 0,92 ± 0,07 | 0,88 ± 0,02 | ns |
| RCE* | 0,58 ± 0,10 | 0,47 ± 0,05 | 0,04 | 0,59 ± 0,12 | 0,53 ± 0,12 | ns |

*Teste Mann-Whitney. **Teste exato de Fisher. HAC NC: Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência de 21-hidroxilase forma não clássica. NC/NC: mutação leve/leve. C/NC: mutação leve/moderada ou grave. IMC: índice de massa corporal. CA: circunferência abdominal. RCQ: relação cintura-quadril. RCE: relação cintura-estatura. PAS: pressão arterial sistólica. PAD: pressão arterial diastólica.
Fonte: a autora.

Na faixa etária de 15-17 anos, os pacientes tiveram peso normal. Entre os pacientes adultos (≥ 18 anos), observou-se sobrepeso em 20% e obesidade em 35% dos casos.

Utilizando-se os critérios das Diretrizes Brasileiras de Dislipidemias (Faludi *et al.*, 2017), nove adultos com HAC-NC e sete controles apresentaram aumento de colesterol total; baixo HDL colesterol esteve presente em quatro pacientes e quatro controles; aumento de triglicérides foi observado em dois pacientes com HAC-NC.

Na Tabela 8, observam-se os resultados dos testes laboratoriais, da composição corporal por DXA e da avaliação da espessura da camada mediointimal das artérias carótidas. Devido a problemas técnicos, as dosagens de insulina, leptina, adiponectina, IL-6 e TNF-alfa foram realizados em menor número de participantes. A avaliação da composição corporal por DXA foi realizada em 22 pacientes e 28 controles. A avaliação da espessura da camada mediointimal das artérias carótidas foi realizada em 23 pacientes e 28 controles.

Os valores de glicemia de jejum e hemoglobina glicada estavam dentro dos níveis normais em pacientes (79 ± 6 mg/dL e $4,9 \pm 0,3\%$) e controles (84 ± 7 mg/dL e $5,0 \pm 0,4\%$) respectivamente. Os pacientes com NC-HAC-21OH apresentaram menores valores de adiponectina em comparação ao grupo controle (236 ± 295 vs

561 ± 527 µg/mL, p=0,03). Não houve diferença na massa magra e massa gorda avaliadas pela DXA entre os grupos. Não houve diferença na espessura da camada mediointimal das artérias carótidas entre os grupos. Quando separados por genótipo, não houve diferença entre os parâmetros analisados entre os subgrupos de pacientes (Tabela 8).

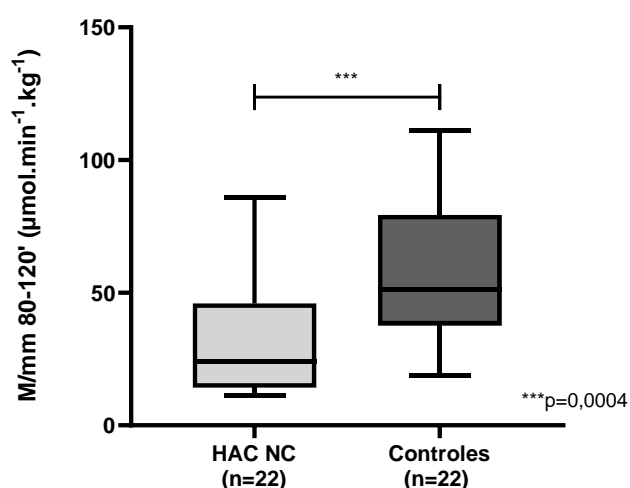
Tabela 8 – Avaliação laboratorial, composição corporal por DXA e espessura da camada mediointimal das carótidas

| | HAC NC | Controles | *p-valor | NC/NC | C/NC | **p-valor |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|-----------------------|-----------------------|-----------|
| Colesterol, mg/dL | | | | | | |
| Total | 169 ± 35 (n=30) | 171 ± 37 (n=30) | ns | 159 ± 32 (n=15) | 180 ± 38 (n=13) | ns |
| HDL | 53 ± 13 (n=30) | 57 ± 15 (n=30) | ns | 50 ± 12 (n=15) | 54 ± 14 (n=13) | ns |
| LDL | 100 ± 26 (n=30) | 100 ± 31 (n=30) | ns | 92 ± 27 (n=15) | 110 ± 26 (n=13) | ns |
| Triglicerídeos, mg/dL | 82 ± 41 (n=30) | 68 ± 31 (n=30) | ns | 83 ± 45 (n=15) | 81 ± 36 (n=13) | ns |
| PCRus, mg/dL | 5,1 ± 5,1 (n=30) | 3,4 ± 3,6 (n=31) | ns | 5,1 ± 5,6 (n=15) | 5,1 ± 5 (n=13) | ns |
| Glicemia de jejum, mg/dL | 79 ± 6 (n=30) | 84 ± 7 (n=32) | 0,006 | 79 ± 7 (n=15) | 78 ± 6 (n=13) | ns |
| A1C, % | 4,9 ± 0,3 (n=30) | 5 ± 0,4 (n=30) | ns | 4,9 ± 0,3 (n=15) | 4,9 ± 0,3 (n=13) | ns |
| Insulina de jejum, µIU/mL | 9 ± 8 (n=29) | 6 ± 3 (n=8) | ns | 11 ± 10 (n=14) | 7 ± 6 (n=13) | ns |
| HOMA-IR | 1,6 ± 1,5 (n=29) | 1,1 ± 0,5 (n=8) | ns | 2,0 ± 1,8 (n=14) | 1,3 ± 1,2 (n=13) | ns |
| Leptina, ng/mL | 9,8 ± 8,5 (n=29) | 8,4 ± 8,3 (n=9) | ns | 10,7 ± 7,8 (n=14) | 8,7 ± 9,1 (n=13) | ns |
| Adiponectina, µg/mL | 236 ± 295 (n=29) | 561 ± 527 (n=9) | 0,03 | 217 ± 287 (n=14) | 251 ± 320 (n=13) | ns |
| IL-6, pg/mL | 7,8 ± 11,6 (n=29) | 20,1 ± 38 (n=9) | ns | 8,3 ± 11,4 (n=14) | 7,6 ± 13 (n=13) | ns |
| TNF-alfa, pg/mL | 2,2 ± 0,8 (n=29) | 2,7 ± 1,6 (n=9) | ns | 2,3 ± 0,9 (n=14) | 2,0 ± 0,7 (n=13) | ns |
| Massa magra, kg (DXA) | 41,3 ± 12,1 (n=22) | 36,7 ± 9,5 (n=28) | ns | 42,9 ± 12,2 (n=11) | 40,3 ± 12,9 (n=10) | ns |
| Massa gorda, kg (DXA) | 29,3 ± 14,4 (n=22) | 25,7 ± 13,3 (n=28) | ns | 29,1 ± 15,7 (n=11) | 30,4 ± 14,1 (n=11) | ns |
| CMI esquerda, mm | 0,57 ± 0,21 (n=23) | 0,47 ± 0,08 (n=28) | ns | 0,5 ± 0,14 (n=10) | 0,64 ± 0,26 (n=11) | ns |
| CMI direita, mm | 0,58 ± 0,22 (n=23) | 0,46 ± 0,10 (n=28) | ns | 0,49 ± 0,11 (n=10) | 0,66 ± 0,28 (n=11) | ns |

HAC NC: Hiperplasia Adrenal Congênita forma não clássica. NC/NC: mutação leve/leve. C/NC: mutação leve/moderada ou grave. A1C: hemoglobina glicada. HOMA-IR: do inglês, *Homeostases Model Assessment-Insulin Resistance*. DXA: composição corporal por dupla emissão de raio-X. CMI: camada mediointimal. ns: não significativo. O *n* indicado abaixo dos resultados correspondem ao número total de dosagens realizadas. Fonte: a autora.

Com relação à avaliação da sensibilidade à insulina realizada durante o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, os resultados obtidos foram demonstrados na Figura 4. Entre os 30 pacientes NC-HAC-21OH do estudo, o *clamp* foi obtido com sucesso em 22 pacientes. Em cinco pacientes, houve dificuldade para acesso venoso; em um, o procedimento precisou ser interrompido por hipoglicemia e, em dois, houve recusa para a realização do procedimento invasivo. Entre os 33 controles, o *clamp* foi obtido com sucesso em 22 participantes, sendo que, em dois pacientes, o procedimento precisou ser interrompido por hipoglicemia e, em nove, houve recusa para a realização do procedimento.

Figura 4 – Avaliação da sensibilidade tecidual à insulina obtida durante *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico entre pacientes e controles



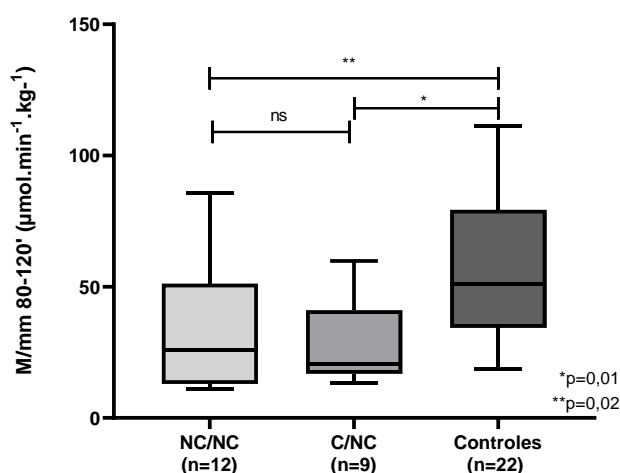
Os dados estão expressos em M/mm 80-120 minutos ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) em pacientes com Hiperplasia Adrenal Congênita forma não clássica (HAC NC) e controles.

Fonte: a autora.

Para análise dos resultados do *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, foi calculado o valor da glicose metabolizada (M) durante os tempos 80-120 minutos do procedimento (período de platô) e corrigido para massa magra (M/mm) obtida em exame de bioimpedância realizada imediatamente antes do início do procedimento, sendo expresso em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$. No grupo de pacientes NC-HAC-21OH, os valores de mediana, p5 e p95 para M/mm foram, respectivamente, 24; 11,4 e 81,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ e, no grupo controle, os valores para M/mm foram 51,1; 19,2 e 109,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$. O valor de glicemia médio durante o período de platô foi de 80mg/dL.

O valor de M/mm no grupo de pacientes HAC-21OH foi menor valor em comparação ao grupo controle ($31,3 \pm 20,2$ vs. $56,8 \pm 25,4 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, $p=0,0004$). Não houve diferença entre os subgrupos de genótipos NC/NC e C/NC ($32,8 \pm 22,9$ vs. $28 \pm 17,9 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, $p=0,75$), mas ambos apresentaram valor de M/mm menor em comparação ao controle (Figura 5). Os subgrupos NC/NC e C/NC estavam recebendo doses similares de glicocorticoide (dose média equivalente de hidrocortisona $5,8 \pm 2,1$ vs $4,4 \pm 3,3 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$, $p=0,8$).

Figura 5 – Avaliação da sensibilidade tecidual à insulina obtida durante *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico entre pacientes com genótipo NC/NC, C/NC e controles



Teste ANOVA. *Diferença entre C/NC e Controles. **Diferença entre NC/NC e Controles. NC/NC: genótipo com duas mutações não clássicas. C/NC: genótipo com uma mutação clássica e uma não clássica.
Fonte: a autora.

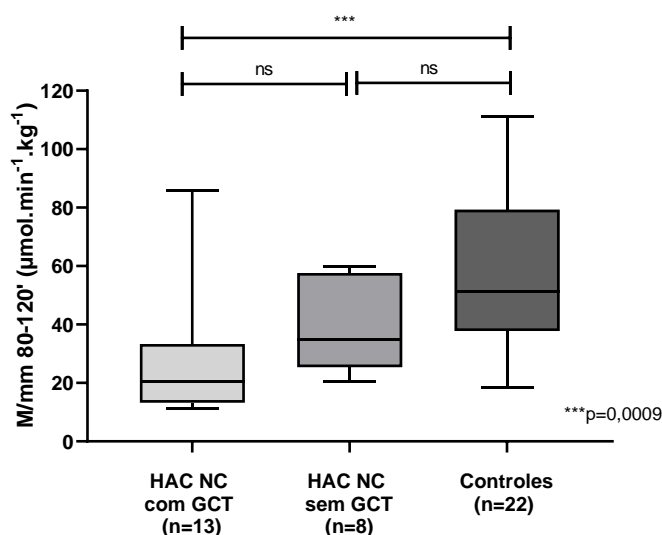
Todos os pacientes avaliados receberam tratamento com glicocorticoides em algum momento do seguimento, com tempo médio de uso de 73 meses (variação de 5-318 meses). No momento da avaliação clínica realizada no presente estudo, 20 pacientes mantinham o uso de glicocorticoide e dez pacientes encontravam-se assintomáticos e com o tratamento suspenso (sete adultos e três crianças).

Dos 22 pacientes que concluíram o *clamp* com sucesso, 13 estavam em uso de glicocorticoide (nove em uso de dexametasona, três com acetato de cortisona e um com prednisona), com dose média equivalente de hidrocortisona $5,5 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$,

e nove encontravam-se sem tratamento e tinham usado uma dose média equivalente de hidrocortisona 5,9 mg/m²/dia.

A Figura 6 mostra o valor de M/mm entre os pacientes com e sem glicocorticoides no momento do *clamp*. Apenas os pacientes em uso de glicocorticoide apresentaram diferença no valor de M/mm em relação aos controles ($27,7 \pm 21,8$ vs. $56,8 \pm 25,4$ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, $p=0,0009$). Um paciente foi excluído dessa análise devido a seguimento irregular e dados não disponíveis sobre dose e duração do tratamento com glicocorticoide.

Figura 6 – Avaliação da sensibilidade tecidual à insulina obtida durante *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico entre pacientes em uso de glicocorticoide, sem glicocorticoide e controles

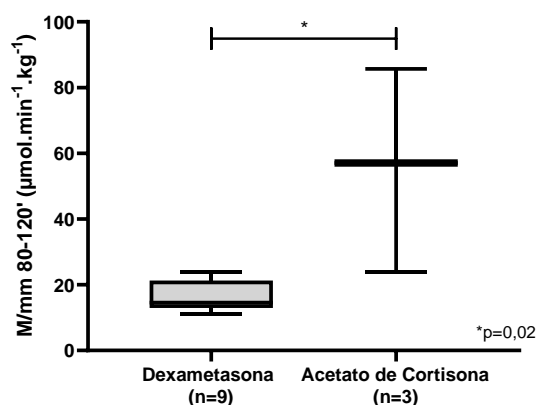


Expresso em M/mm 80-120 minutos ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$). Teste de Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn's. GCT: glicocorticoide.

Fonte: a autora.

A Figura 7 mostra a avaliação de M/mm em relação ao tipo de glicocorticoide em uso no momento do CEH. Os pacientes em uso de dexametasona apresentaram valor de M/mm menor em relação àqueles em uso de acetato de cortisona ($16,7 \pm 4,7$ vs $55,5 \pm 30,9$ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, $p=0,02$). Porém, os pacientes em uso de acetato de cortisona eram mais jovens (variação de idade de 10 a 15 anos) do que os pacientes em uso de dexametasona (variação de idade de 15 a 48 anos).

Figura 7 – Avaliação da sensibilidade tecidual à insulina obtida durante *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico entre pacientes usando dexametasona vs acetato de cortisona



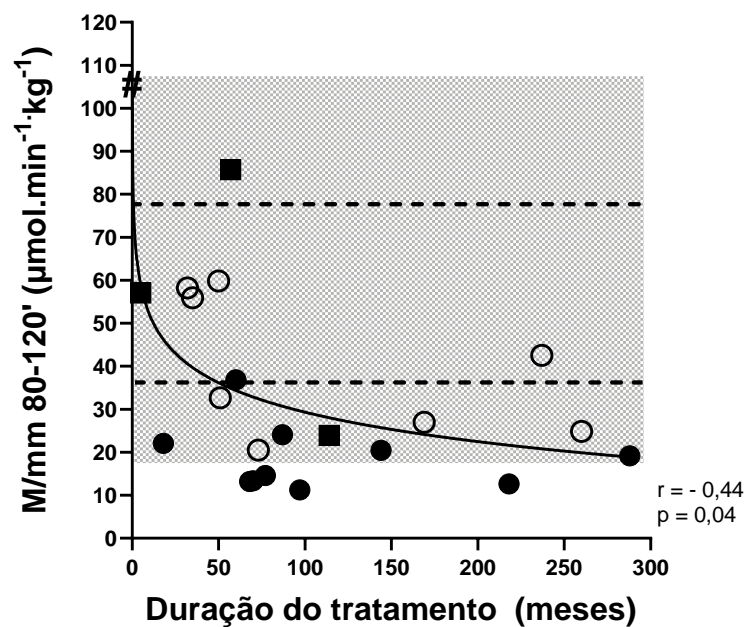
Teste de Mann-Whitney. Expresso em M/mm 80-120 minutos ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$).
Fonte: a autora.

Como todos os pacientes estavam usando ou usaram previamente glicocorticoide, os valores de M/mm tiveram uma correlação inversa com a duração do tempo de tratamento com glicocorticoide ($r = -0,44$, $p = 0,04$, Figura 8). Após 60 meses de tratamento, 62% (13/21) dos pacientes apresentaram valores de M/mm abaixo do percentil 25 observado no grupo controle (Figura 8).

Durante a realização deste trabalho, uma paciente de 47 anos, do sexo feminino, com hirsutismo e irregularidade menstrual desde a puberdade foi diagnosticada com a forma não clássica da HAC-21OH e foi avaliada por meio do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico. Ela não havia recebido tratamento prévio com glicocorticoide e apresentou o maior valor de M/mm entre todos os pacientes do estudo, porém não foi incluída nas análises previamente mostradas (Figura 8).

Não houve correlação entre o tempo sem glicocorticoide e o valor de M/mm ($r = 0,1$, $p = 0,7$) tampouco entre os níveis de adiponectina e os valores de M/mm ($r = 0,05$; $p = 0,8$). Também não foi observada associação entre os valores de andrógenos avaliados pela média dos dois últimos valores de androstenediona dos últimos 24 meses de seguimento anteriores à avaliação clínica, comparados ao valor de M/mm ($r = -0,2$; $p = 0,4$).

Figura 8 – Correlação da sensibilidade tecidual à insulina obtida durante *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico e tempo de uso de glicocorticoides



Os dados foram expressos em M/mm 80-120 minutos ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) e tempo de tratamento com glicocorticoides em meses. A área hachurada representa o percentil 5-95 e as linhas pontilhadas representam o percentil 25-75 do grupo controle. Os círculos preenchidos e vazados representam, respectivamente, os pacientes com e sem glicocorticoide no momento da avaliação, respectivamente. Os quadrados preenchidos representam os pacientes em uso de acetato de cortisona. # representa uma paciente que nunca foi tratada.
Fonte: a autora.

5. DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, por meio da técnica do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, demonstrou-se menor sensibilidade à insulina em pacientes com NC-HAC-21OH, associada ao uso prolongado de glicocorticoides e glicocorticoide de longa ação, como a dexametasona, independentemente do genótipo C/NC ou NC/NC. Esses novos dados adicionam importantes informações para o manejo clínico de pacientes com a forma não clássica, já que estudos anteriores foram realizados principalmente com pacientes da forma clássica (Kroese *et al.*, 2009; Tamhane *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2021). A resistência à insulina associada a aumento da relação cintura-quadril, maiores níveis pressóricos em crianças e adolescentes e menor adiponectina demonstra a necessidade de acompanhamento regular do maior risco cardiometabólico encontrado nesses pacientes.

Essa série de pacientes apresentou manifestações tipicamente descritas na literatura, com crianças com pubarca precoce, avanço de idade óssea, acne e clitoromegalia (El-Maouche Arit; Merke, 2017); e adolescentes e adultas manifestando-se com irregularidade menstrual, hirsutismo e clitoromegalia (Speiser *et al.*, 2018).

O grupo de pacientes C/NC apresentou menor idade de pubarca e maiores níveis de 17OHP basal e após ACTH em comparação ao grupo NC/NC. Esses dados estão de acordo com um trabalho anterior que descreveu maiores valores de 17OHP em pacientes com genótipo C/NC da NC-HAC-21OH (Livadas *et al.*, 2014), confirmando que o maior prejuízo na função enzimática nas mutações graves e moderadas do gene *CYP21A2* reflete na biossíntese hormonal. Já havíamos demonstrado níveis normais de cortisol basal, porém com resposta anormal após estímulo com ACTH em pacientes com NC-HAC-21OH comparados a controles e heterozigotos, confirmando que o defeito da biossíntese enzimática influencia os níveis hormonais (Elias *et al.*, 1993; Moreira; Elias, 1992).

A mutação mais frequentemente encontrada no genótipo NC/NC foi a p.V281L, enquanto as variantes alélicas associadas com a forma clássica, presentes no genótipo C/NC, foram p.I172N, IVS2-13A/C>G, Δ 8, CL6, p.Q318X, e p.R356W. Tais resultados são compatíveis com estudos anteriores de avaliação

das mutações mais prevalentes no Brasil (Coeli-Lachinni *et al.*, 2013) e no mundo (Speiser *et al.*, 2018).

Com relação ao peso, os pacientes foram divididos em subgrupos por idade: crianças e adolescentes: 10-14 anos, 15-17 anos. No primeiro grupo, 28% apresentam sobrepeso e 57% obesidade. Na faixa etária de 15-17 anos, os pacientes tiveram peso normal. Dados nacionais apontam prevalência de 19,4% de sobrepeso e 6,7% de obesidade em adolescentes de 15 a 17 anos (IBGE, 2020).

Entre os pacientes adultos (≥ 18 anos), observou-se sobrepeso em 20% dos casos e obesidade em 35%. Dados nacionais apontam sobrepeso e obesidade em 60,3% e 25,9% da população respectivamente (IBGE, 2020), demonstrando que pacientes adultos com NC-HAC-21OH apresentam maiores níveis de obesidade em relação à população brasileira.

Alguns estudos anteriores também descreveram aumento de obesidade na forma clássica (Arlt *et al.*, 2010; Yoon; Cheon, 2020). Um grupo de pesquisadores em Israel avaliou fatores de risco semelhantes em crianças e adolescentes com a forma NC-HAC-21OH, encontrando taxas de sobrepeso e obesidade semelhantes com a população geral (de Vries *et al.*, 2019). Observa-se que a incidência de obesidade é variável nos pacientes com HAC-21OH.

Na avaliação antropométrica, não houve diferença na medida da circunferência abdominal entre os grupos, mas tanto os pacientes adultos quanto crianças e adolescentes com NC-HAC-21OH apresentaram maior relação cintura-quadril em relação ao grupo controle, denotando maior adiposidade abdominal. Achados semelhantes têm sido descritos em pacientes com a forma clássica, com maior relação cintura-estatura e obesidade (Ariyawatkul *et al.*, 2017; Seraphim *et al.*, 2019).

Não houve diferença nos níveis de pressão arterial entre os grupos de pacientes e controles adultos. Já entre as crianças e adolescentes, maiores níveis de PAS e hipertensão sistólica foram observados. Maior incidência de hipertensão arterial foi encontrada em estudos com a forma clássica e não clássica (Falhammar *et al.*, 2015; Tamhane *et al.*, 2018).

Um estudo brasileiro avaliou 40 pacientes com a forma clássica da HAC-21OH e demonstrou aumento da PA sistólica e da espessura da CMI das carótidas (Rodrigues *et al.*, 2015). Outros estudos também demonstraram aumento da espessura da CMI e maior incidência de fatores de risco cardiometabólico em adultos com a forma clássica (Sartorato *et al.*, 2007; Fahlammar *et al.*, 2015).

Os valores de glicemia de jejum, hemoglobina glicada, insulina em jejum e HOMA-IR foram normais nos grupos NC-HAC-21OH e controles. Estudos que avaliaram pacientes com a forma clássica da HAC-21OH encontraram maior índice HOMA-IR (Moreira *et al.*, 2012; Paizoni *et al.*, 2020). Uma revisão sistemática e metanálise com 437 pacientes (29 com a forma não clássica) também demonstrou maior resistência à insulina avaliada por HOMA-IR, maiores níveis pressóricos e maior espessura da CMI das carótidas nessa população (Tamhane *et al.*, 2018). Os achados apresentados no presente estudo estão de acordo com os encontrados na metanálise no que se refere a maior resistência à insulina e hipertensão, mas não em relação ao aumento da espessura da CMI.

Fahlammar e colaboradores avaliaram 407 pacientes com a forma clássica e 75 com forma não clássica e demonstraram aumento de morbididades metabólicas e cardiovasculares nesses pacientes (Fahlammar *et al.*, 2015). Os dados relacionados à disfunção endotelial são contraditórios na literatura. Muitos estudos demonstram aumento da espessura da CMI da carótida, mas alguns fatores que são difíceis de controlar podem interferir nesses resultados, como heterogeneidade da população, marcadores inflamatórios e resistência à insulina (Tamhane *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2015). No presente estudo, não se confirmou o aumento da espessura da CMI das artérias carótidas em pacientes NC-HAC-21OH e controles. A população de pacientes é jovem e esse fator pode ter influenciado na não manifestação desse marcador de doença aterosclerótica subclínica. O acompanhamento em longo prazo poderá confirmar esse achado.

Os níveis séricos de adiponectina foram menores no grupo de pacientes em comparação aos controles. Esse achado é semelhante ao relatado em estudos com pacientes adultos portadores da forma clássica (Zhang *et al.*, 2010). Já foi demonstrada redução dos níveis de adiponectina em pacientes utilizando glicocorticoides, por meio da inibição do RNA mensageiro pela dexametasona em adipócitos subcutâneos e viscerais (Degawa-Yamauchi *et al.*, 2005).

É conhecida a importância da adiponectina como fator anti-inflamatório e sensibilizador de insulina (Maury *et al.*, 2010) e a hipoadiponectinemia tem sido observada em diversas alterações metabólicas, como obesidade, resistência à insulina, hipertensão, diabetes mellitus tipo 2, doença cardiovascular e síndrome metabólica (Bueno *et al.*, 2014) e pacientes em uso de glicocorticoides (Böttner *et al.*, 2004). Outros parâmetros metabólicos avaliados no presente estudo foram similares entre os grupos de pacientes e controles e entre os pacientes que estavam em uso de glicocorticoides ou que os haviam utilizado previamente.

No presente estudo, realizou-se a avaliação da sensibilidade à insulina por meio do CEH, o método padrão ouro para essa avaliação e com melhor reprodutibilidade. A menor sensibilidade à insulina está relacionada com intolerância à glicose, dislipidemia e aumento dos níveis pressóricos e desempenha um papel importante no desenvolvimento da aterosclerose e no risco de doenças cardiovasculares (DeFronzo; Tobin; Andres, 1979; Ferranini; Mari, 1998).

Os valores de M/mm encontrados no grupo controle foram similares aos descritos em população branca não diabética, normotensa, com IMC >25 kg/m², com mediana de 53 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ em homens e mulheres, com variação de 20 a 84 e 19 a 87 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ respectivamente (Ferranini; Mari, 1998).

No grupo de pacientes NC-HAC-21OH, o valor de M/mm foi menor em comparação ao grupo controle e não houve diferença entre os subgrupos NC/NC e C/NC, apesar de ambos apresentarem valor de M/mm mais baixo em comparação ao controle. Um estudo encontrou menor sensibilidade à insulina por meio de CEH em pacientes com a forma clássica da HAC-21OH em comparação a um grupo controle (Kroese *et al.*, 2009), enquanto um estudo brasileiro encontrou resistência à insulina e hiperinsulinemia compensatória, por meio de *clamp* hiperglicêmico, em pacientes com a forma clássica (Oliveira *et al.*, 2021). De modo similar, o presente estudo com grupo de pacientes portadores da forma não clássica da HAC-21OH demonstra menor sensibilidade à insulina, independentemente do genótipo e do peso. Tendo em vista que os estudos anteriores utilizando a técnica de *clamp* foram realizados em pacientes com a forma clássica da HAC-21OH, ressalta-se que os dados deste estudo são inéditos na literatura.

A relação entre hiperandrogenismo e resistência à insulina na HAC-21OH é conhecida (Paula *et al.*, 1994; Tamhane *et al.*, 2018; Paizoni *et al.*, 2020). Pacientes com a forma clássica da HAC-21OH em uso de prednisona e dexametasona podem manter a secreção circadiana rítmica da 17OHP e androstenediona, porém com grandes flutuações nesses hormônios, possivelmente por um efeito da regulação circadiana endógena no núcleo supraquiasmático (Debono *et al.*, 2015), o que sugere que a supressão androgênica pode ser transitória, mesmo nos pacientes em uso de glicocorticoides de longa duração com grande variabilidade interindividual.

Para avaliar tal efeito sobre o valor de M/mm, a média dos níveis de androstenediona dos 24 meses que antecederam a avaliação clínica foi analisada, não tendo sido identificado correlação. Apesar de apresentar menor flutuação diurna, a androstenediona pode sofrer influência do horário de uso do glicocorticoide (Paizoni *et al.*, 2020), o que limita a análise desse androgênio isoladamente como controle da doença, já que pode haver um aumento de androgênios da via alternativa conhecida como “via da porta dos fundos” (*backdoor androgen pathway*, do inglês) em adultos tratados para HAC-21OH (Debono *et al.*, 2015). Dessa forma, não se pode excluir que a hipótese de que a menor sensibilidade à insulina encontrada neste estudo possa ser parcialmente relacionada ao hiperandrogenismo leve dos portadores de NC-HAC-21OH.

Maior resistência à insulina em *clamp* de pacientes portadoras de Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) tem sido relatada (Strepto *et al.*, 2013) e as mulheres com NC-HAC-21OH podem apresentar morfologia ovariana policística (Carmina *et al.*, 2017), não sendo possível excluir totalmente a hipótese de que a maior resistência insulínica observada nas mulheres com NC-HAC-21OH no presente estudo possa ser parcialmente associada com o hiperandrogenismo relacionado à SOP.

Ainda, a resistência à insulina apresentou correlação inversa com a duração do tratamento de glicocorticoides ($p=-0,54$). Houve redução da sensibilidade à insulina após 60 meses de uso, tanto em pacientes com tratamento atual quanto naqueles que utilizaram o glicocorticoide previamente. Também foi observada associação entre o tipo de glicocorticoide em uso de a sensibilidade à insulina. Aqueles em uso de dexametasona apresentaram valores de M/mm mais baixos em

relação aos que utilizavam acetato de cortisona. Todavia, o acetato de cortisona é usado em pacientes mais jovens, com menor tempo de diagnóstico da doença e consequentemente menor tempo de tratamento, e apenas um pequeno número de pacientes foi analisado neste trabalho. É interessante notar que o paciente com maior tempo de uso de cortisona apresentou o menor valor de M/mm. Estudos anteriores que utilizaram *clamp* na avaliação de sensibilidade à insulina não relacionaram os achados do *clamp* com a dose, tipo ou tempo de uso de glicocorticoide (Kroese *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2021).

A secreção de cortisol é usualmente mantida nos pacientes portadores da forma não clássica de HAC-21OH (Moreira; Elias, 1992) e o ritmo circadiano pode existir em crianças sem tratamento (Frisch *et al.*, 1981). O cortisol exerce efeito de transdução de sinais relacionados ao ritmo circadiano no núcleo supraquiasmático a fim de redefinir os genes do relógio em tecidos periféricos (Moreira; Antonini; Castro, 2018). O tratamento com glicocorticoides sintéticos altera a flutuação circadiana do cortisol e contribui para o desenvolvimento de doenças relacionadas com resistência à insulina e síndrome metabólica (Debono *et al.*, 2015; Lightman *et al.*, 2020).

Dessa forma, tanto o hiperandrogenismo quanto o tratamento com glicocorticoides afetam o metabolismo da glicose, e o acompanhamento dos portadores da forma não clássica da HAC-21OH deve incluir a reavaliação constante dos sintomas clínicos e efeitos adversos potencialmente relacionados com o tratamento ou com a doença. O tratamento para mulheres com hiperandrogenismo pela forma não clássica da HAC-21OH que não estejam planejando gestação deve levar em conta o uso de outras terapias, como os contraceptivos orais e antiandrogênicos, conforme orientação das últimas diretrizes (Speiser *et al.*, 2018).

A técnica para realização do *clamp* é trabalhosa, invasiva e apresenta potenciais efeitos adversos, justificando o número pequeno de pacientes NC-HAC-21OH e controles do presente estudo, o que pode ter resultado em menor poder estatístico em algumas análises. Além disso, os exames de ultrassom de carótidas e a avaliação da composição corporal por DXA foram realizados pelo setor de Radiologia em dias preestabelecidos, o que dificultou a realização de toda a avaliação clínica em uma única visita. Em razão disso, alguns participantes tiveram

dificuldade para retornar em um outro dia para finalizar a pesquisa. Por fim, devido à pandemia de covid-19, houve atraso na chegada dos kits para dosagem de adiponectinas, leptina, IL-6 e TNF-alfa e, por isso, essas dosagens foram realizadas em número menor de amostras.

A relevância do presente estudo encontra-se na avaliação inédita da sensibilidade à insulina por meio do CEH, método padrão ouro, em uma série de pacientes com NC-HAC-21OH, demonstrando que apresentam maior resistência à insulina e essa é relacionada ao tempo de uso e ao tipo de glicocorticoide. Esse achado é de grande aplicabilidade clínica, pois reforça que o tratamento com glicocorticoide apenas deve ser utilizado quando estritamente necessário e pelo menor tempo possível, assim como monitorado regularmente para a prevenção de complicações cardiometabólicas.

6. CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Pela primeira vez na literatura, demonstrou-se redução da sensibilidade à insulina avaliada por *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico em um grupo de pacientes portadores da forma não clássica da HAC-21OH. Tal achado está relacionado com o tempo e tipo de glicocorticoide utilizado no tratamento. Além da menor sensibilidade à insulina, maior adiposidade abdominal foi encontrada nos pacientes adultos e maior pressão arterial sistólica nas crianças e adolescentes com NA-HAC-21OH. Esses achados são reconhecidos como fatores de risco para o desenvolvimento de doença cardiometabólica.

Ressalta-se a relevância deste achado para o manejo clínico desses doentes, para que sejam constantemente avaliados quanto à necessidade de manutenção da terapia com glicocorticoides, bem como monitorados regularmente do ponto de vista de fatores de risco cardiometabólico para melhores desfechos clínicos em longo prazo.

Estudos futuros de avaliação de risco em um número maior de pacientes com a forma não clássica da HAC-21OH, incluindo pacientes mais velhos, serão necessários para estabelecer a prevalência de doenças cardiometabólicas nessa população.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

- Almeida MQ, Kaupert LC, Brito LP, Lerario AM, Mariani BMP, Ribeiro M et al. Increased expression of ACTH (MC2R) and androgen (AR) receptors in giant bilateral myelolipomas from patients with congenital adrenal hyperplasia. *BMC endocrine disorders*. 2014;14:42. doi: 10.1186/1472-6823-14-42
- Araújo RS, Billerbeck AEC, Madureira G, Mendonça BB, Bachega TASS. Substitutions in the CYP21A2 promoter explain the simple-virilizing form of 21-hydroxylase deficiency in patients harbouring a P30L mutation. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005;62(2):132-6. doi: 10.1111/j.1365-2265.2005.02184.x.
- Ariyawatkul K, Tepmongkol S, Aroonparkmongkol S, Sahakitrungruang T. Cardio-metabolic risk factors in youth with classical 21-hydroxylase deficiency. *Eur J Pediatr*. 2017;176(4):537-45. doi: 10.1007/s00431-017-2875-2.
- Arlt W, Willis DS, Wild SH, Krone N, Doherty EJ, Hahner S. Health status of adults with congenital adrenal hyperplasia: a cohort study of 203 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(11):5110-21. doi: 10.1210/jc.2010-0917.
- Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Diretrizes brasileiras de obesidade. 4 ed. São Paulo, SP; 2016. 188p. Disponível em: <https://abeso.org.br/wp-content/uploads/2019/12/Diretrizes-Download-Diretrizes-Brasileiras-de-Obesidade-2016.pdf>
- Auchus RJ, Buschur EO, Chang AY, Hammer GD, Ramm C, Madrigal D et al. Abiraterone acetate to lower androgens in women with classic 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(8):2763-70. doi: 10.1210/jc.2014-1258.
- Auchus RJ, Sarafoglou K, Fechner PY, Vogiatzi MG, Imel EA, Davis SM et al. Crinicerfont Lowers Elevated Hormone Markers in Adults with 21-Hydroxylase Deficiency Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;dgab749. doi: 10.1210/clinem/dgab749. Online ahead of print.
- Auchus RJ. Management considerations for the adult with congenital adrenal hyperplasia. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;408:190-7. doi: 10.1016/j.mce.2015.01.039.
- Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Arnhold IJ, Medeiros MA, Marcondes JA et al. Low frequency of CYP2B deletions in Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Human heredity*. 1999;49(1):9-14. doi: 10.1159/000022833.
- 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. doi: 10.1210/jcem.83.12.5350.

¹ Elaboradas de acordo com as Normas de Vancouver.

Bachega TA, Billerbeck AE, Marcondes J A, Madureira G, Arnhold I J, Mendonca B B. 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. doi: 10.1046/j.1365-2265.2000.00995.x.

Bachega TASS, Billerbeck AEC, Parente EB, Lemos-Marini SHV, Baptista MTM, Mello MP et al. Multicentric study of Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency: a genotype-phenotype correlation. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004;48(5):697-704. doi: 10.1590/s0004-27302004000500016.

Barroso WKS, Rodrigues CIS, Bortolotto LA, Mota-Gomes MA, Brandão AA, Feitosa ADM et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial - 2020. *Arq Bras Cardiol*. 2021;116(3):516-658. doi: 10.36660/abc.20201238

Bazzocchi A, Ponti F, Albisinni U, Battista G, Guglielmi G. DXA: Technical aspects and application. *Eur J Radiol*. 2016;(85):1481–92. doi: 10.1016/j.ejrad.2016.04.004.

Bidet M, Bellané-Chantelot C, Galand-Portier MB, Golmard JL, Tardy V, Morel Y. et al. Fertility in women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(3):1182-90. doi: 10.1210/jc.2009-1383.

Borges JH, Santoro RI, de-Oliveira DM, de-Lemos-Marini SHV, Geloneze B, Guerra-Júnior G et al. Cardiovascular dysfunction risk in young adults with congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase enzyme deficiency. *Int J Clin Pract*. 2021;75(7):e14233. doi: 10.1111/ijcp.14233.

Böttner A, Kratzsch J, Müller G, Kapellen TM, Blüher S, Keller E, Blüher M et al. Gender differences of adiponectin levels develop during the progression of puberty and are related to serum androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(8):4053-61. doi: 10.1210/jc.2004-0303.

Bouvattier C, Esterle L, Renoult-Pierre P, Brac de la Perrière A, Illouz F, Kerlan V et al. Clinical outcome, hormonal status, gonadotrope axis, and testicular function in 219 adult men born with classic 21-hydroxylase deficiency. A French National Survey. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(6):2303-13. doi: 10.1210/jc.2014-4124.

Bueno AC, Sun K, Martins CS, Elias Junior J, Miranda W, Tao C et al. A novel ADIPOQ mutation (p.M40K) impairs assembly of high-molecular-weight adiponectin and is associated with early-onset obesity and metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(4):e683-93. doi: 10.1210/jc.2013-3009.

Carmina E, Dewailly D, Escobar-Morreale HF, Kelestimur F, Moran C, Oberfield S et al. Non-classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency revisited: an update with a special focus on adolescent and adult women. *Hum Reprod Update*. 2017;23(5):580-99. doi: 10.1093/humupd/dmx014.

Casteràs A, de Silva P, Rumsby G, Conway GS. Reassessing fecundity in women with classical congenital adrenal hyperplasia (CAH): normal pregnancy rate but

reduced fertility rate. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;70(6):833-7. doi: 10.1111/j.1365-2265.2009.03563.x.

Claahsen-van der Grinten HL, Otten BJ, Hermus ARMM, Sweep FCGJ, Hulsbergen-van de Kaa CA. Testicular adrenal rest tumors in patients with congenital adrenal hyperplasia can cause severe testicular damage. *Fertil Steril*. 2008;89(3):597-601. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.03.051.

Claahsen-van der Grinten HL, Speiser PW, Ahmed SF, Arlt W, Auchus RJ, Falhammar H et al. Congenital adrenal hyperplasia - current insights in pathophysiology, diagnostics and management. *Endocr Rev*. 2021; bna016. doi: 10.1210/endo/bna016. Online ahead of print.

Coeli-Lacchini FB, Turatti W, Elias PCL, Elias LLK, Martinelli Jr CE et al. A rational, non-radioactive strategy for the molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Gene*. 2013;526(2):239-45. doi: 10.1016/j.gene.2013.03.082.

de Carvalho DF, Miranda MC, Gomes LG, Madureira G, Marcondes JA, Billerbeck AE et al. Molecular CYP21A2 diagnosis in 480 Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia before newborn screening introduction. *Eur J Endocrinol*. 2016;175(2):107-16. doi: 10.1530/EJE-16-0171.

de Vries L, Lebenthal Y, Phillip M, Shalitin S, Tenenbaum A, Bello R. Obesity and Cardiometabolic Risk Factors in Children and Young Adults With Non-classical 21-Hydroxylase Deficiency. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:698. doi: 10.3389/fendo.2019.00698.

de-Araujo M, Sanches MR, Suzuki LA, Guerra G Jr, Farah SB, de-Mello MP. Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Braz J Med Biol Res*. 1996;29(1):1-13. PMID: 8731325.

Debono M, Mallappa A, Gounden V, Nella AA, Harrison RF, Crutchfield CA et al. Hormonal circadian rhythms in patients with congenital adrenal hyperplasia: identifying optimal monitoring times and novel disease biomarkers. *Eur J Endocrinol*. 2015;173(6):727-37. doi: 10.1530/EJE-15-0064.

DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 1979;237(3):e214-23. doi: 10.1152/ajpendo.1979.237.3.e214.

Degawa-Yamauchi M, Moss KA, Bovenkerk JE, Shankar SS, Morrison CL, Lelliott CJ, et al. Regulation of adiponectin expression in human adipocytes: effects of adiposity, glucocorticoids, and tumor necrosis factor alpha. *Obes Res* 2005;13(4):662-9. doi: 10.1038/oby.2005.74.

Elias LL, Voltarelli JC, Moreira AC. Adrenal response to adrenocorticotropin hormone and HLA typing of subjects with different degrees of 21-hydroxylase deficiency. *Braz J Med Biol Res*. 1993;26(2):177-89. PMID: 8257919.

Elias LLK, Moreira AC. Aspectos clínicos e laboratoriais da forma não clássica de hiperplasia adrenal congênita por deficiência de 21-hidroxiase. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 1992;36(3):72-5. doi: 10.1590/S0004-27302003000500002

El-Maouche D, Arlt W, Merke DP. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet.* 2017;390(10108):2194-210. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31431-9.

El-Maouche D, Merke DP, Vogiatzi MG, Chang AY, Turcu AF, Joyal EG et al. A Phase 2, Multicenter Study of Nevanimibe for the Treatment of Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020; 105(8):2771-8. doi: 10.1210/clinem/dgaa381.

Falhammar H, Frisén L, Hirschberg AL, Norrby C, Almqvist C, Nordenskjöld A et al. Increased Cardiovascular and Metabolic Morbidity in Patients With 21-Hydroxylase Deficiency: A Swedish Population-Based National Cohort Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(9):3520-8. doi: 10.1210/JC.2015-2093.

Falhammar H, Frisén L, Norrby C, Hirschberg AL, Almqvist C, Nordenskjöld A et al. Increased mortality in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(12):e2715-21. doi: 10.1210/jc.2014-2957.

Falhammar H, Nordenström A. Nonclassic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: clinical presentation, diagnosis, treatment, and outcome. *Endocrine.* 2015;50(1):32-50. doi: 10.1007/s12020-015-0656-0.

Faludi AA, Izar MCO, Saraiva JFK, Chacra APM, Bianco HT, Afiune Neto A et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e prevenção da aterosclerose 2017. *Arq Bras Cardiol.* 2017;109(2 Supl 1):1-76. doi: 10.5935/abc.20170121.

Favaretto F, Bettini S, Busetto L, Milan G, Vetto R. Adipogenic progenitors in different organs: Pathophysiological implications. *Rev Endocr Metab Disord.* 2021;1-15. doi: 10.1007/s11154-021-09686-6.

Ferrannini E, Mari A. How to measure insulin sensitivity. *J Hypertens.* 1998;16(7):895-906.

Finkelstein GP, Kim MS, Sinaii N, Nishitani M, Van Ryzin C, Hill SC et al. Clinical characteristics of a cohort of 244 patients with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(12):4429-38. doi: 10.1210/jc.2012-2102.

Frisch H, Parth K, Schober E, Swoboda W. Circadian patterns of plasma cortisol, 17-hydroxyprogesterone, and testosterone in congenital adrenal hyperplasia. *Arch Dis Child.* 1981;56(3):208-13. doi: 10.1136/adc.56.3.208.

Gełoneze B, Vasques ACJ, Stabe CFC, Pareja JC, Rosado LEFPL, Queiroz EC et al. Índices HOMA1-IR e HOMA2-IR para identificação de resistência à insulina e síndrome metabólica: Estudo Brasileiro de Síndrome Metabólica (BRAMS). *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009;53(2):281-7. doi: 10.1590/S0004-27302009000200020

Gomes LG, Huang N, Agrawal V, Mendonça BB, Bachega TASS, Miller WL. Extraadrenal 21-hydroxylation by CYP2C19 and CYP3A4: effect on 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(1):89-95. doi: 10.1210/jc.2008-1174

Gomes LG, Mermejo LM, Bachega TA, Castro M. Hiperplasia Adrenal Congenita em: Saad MJA, et al. *Endocrinologia Princípios e Práticas.* 2 ed. Atheneu. 2017. Cap 46:771-92.

Hagenfeldt K, Janson PO, Holmdahl G, Falhammar H, Filipsson H, L. Frisén 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. doi: 10.1093/humrep/den118.

Han TS, Stimson RH, Rees DA, Krone N, Willis DS, Conway GS, Arlt W, Walker BR, R J Ross R. Glucocorticoid treatment regimen and health outcomes in adults with congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013;78(2):197-203. doi: 10.1111/cen.12045.

Harrington J, Peña AS, Gent R, Hirte C, Couper J. Adolescents with congenital adrenal hyperplasia because of 21-hydroxylase deficiency have vascular dysfunction. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012;76(6):837-42. doi: 10.1111/j.1365-2265.2011.04309.x.

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,* 2011;55(8):632-7. doi: 10.1590/S0004-27302011000800019

Hayashi GY, Carvalho DF, de Miranda MC, Faure C, Vallejos C, Brito VN et al. Neonatal 17-hydroxyprogesterone levels adjusted according to age at sample collection and birthweight improve the efficacy of congenital adrenal hyperplasia newborn screening. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2017;86(4):480-7. doi: 10.1111/cen.13292.

Higashi Y, Hiromasa T, Tanae A, Miki T, Nakura J, Kondo T et al. Effects of individual mutations in the P-450(C21) pseudogene on the P-450(C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biochem.* 1991;109(4):638-44. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123433.

Hinton BJ, Fan B, Ng BK, Shepherd JA. Dual energy X-ray absorptiometry body composition reference values of limbs and trunk from NHANES 1999–2004 with additional visualization methods. *PLoS One.* 2017;12(3):e0174180. doi: 10.1371/journal.pone.0174180

Hirschberg AL, Gidlöf S, Falhammar H, Frisén L, Almqvist C, Nordenskjöld A et al. Reproductive and perinatal outcomes in women with congenital Adrenal Hyperplasya: a population-based cohort study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021;106(2):e957-65. doi: 10.1210/clinem/dgaa801.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Diretoria de Pesquisas, Pesquisa Nacional de Saúde 2019. Ministério da Saúde. 2020. 57p. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-detalle-de-midia.html?view=mediaibge&catid=2103&id=4222>.

Jääskeläinen J, Hippeläinen M, Kiekara O, Voutilainen R. Child rate, pregnancy outcome and ovarian function in females with classical 21-hydroxylase deficiency. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000;79(8):687-92. PMID: 10949235

Jourdan C, Wühl E, Litwin M, Fahr K, Trelewicz J, Jobs K. et al. Normative values for intima-media thickness and distensibility of large arteries in healthy adolescents. *J Hypertens*. 2005;23(9):1707-15. doi: 10.1097/01.hjh.0000178834.26353.d5.

Karpe F; Pinnick KE. Biology of upper-body and lower-body adipose tissue - link to whole-body phenotypes. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(2):90-100. doi: 10.1038/nrendo.2014.185.

Kim MS, Merke DP. Cardiovascular disease risk in adult women with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Semin Reprod Med*. 2009;27(4):316-21. doi: 10.1055/s-0029-1225259.

Kopacek C, de Castro SM, Prado MJ, da Silva CM, Beltrão LA, Spritzer PM. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in Southern Brazil: a population based study with 108,409 infants. *BMC Pediatrics*. 2017;17(1):22. doi: 10.1186/s12887-016-0772-x.

Kroese JM, Mooij CF, van der Graaf M, Hermus ARMM, 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. doi: 10.1530/EJE-09-0523.

Lecke SB, Morsch DM, Spritzer PM. Leptin and adiponectin in the female life course. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44(5):1-8. doi: 10.1590/S0100-879X2011007500035

Leite MV, Mendonça BB, Arnhold IJ, Estefan V, Nunes C, Nicolau W, et al. Identification of nonclassical 21-hydroxylase deficiency in girls with precocious pubarche. *J Endocrinol Invest*. 1991;14(1):11-5. doi: 10.1007/BF03350247.

Lightman SL, Birnie MT, Conway-Campbell BL. Dynamics of ACTH and Cortisol Secretion and Implications for Disease. *Endocr Rev*. 2020;41(3):470-90. doi: 10.1210/edrev/bnaa002.

Liu F, He J, Wang H, Zhu D, Bi Y. Adipose morphology: a critical factor in regulation of human metabolic diseases and adipose tissue dysfunction. *Obes Surg*. 2020;30(12):5086–100. doi: 10.1007/s11695-020-04983-6.

Livadas S, Dracopoulou M, Dastamani A, Sertedaki A, Maniati-Christidi M, Magiakou AM, et al. The spectrum of clinical, hormonal and molecular findings in 280 individuals with nonclassical congenital adrenal hyperplasia caused by

mutations of the CYP21A2 gene. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015;82(4):543-9. doi: 10.1111/cen.12543

Mallappa A, Sinaii N, Kumar P, Whitaker MJ, Daley LA, Digweed D et al. A phase 2 study of Chronocort, a modified-release formulation of hydrocortisone, in the treatment of adults with classic congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(3):1137-45. doi: 10.1210/jc.2014-3809.

Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;314(1):1-16. doi: 10.1016/j.mce.2009.07.031.

Merke DP, Auchus RJ. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to 21-Hydroxylase Deficiency *N Engl J Med*. 2020;383:1248-61.

Merke DP, Bornstein SR, Avila NA, Chrousos GP. Future directions in the study and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Ann Intern Med*. 2002;136(4):320-34. doi: 10.7326/0003-4819-136-4-200202190-00012.

Mermejo LM, Elias LL, Marui S, Moreira AC, Mendonca BB, de Castro M. Refining Hormonal Diagnosis of Type II 3 - Hydroxysteroid Dehydrogenase Deficiency in Patients with Premature Pubarche and Hirsutism Based on HSD3B2 Genotyping. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(3):1287-93. doi: 10.1210/jc.2004-1552.

Mermejo LM, Coeli-Lacchini F, Turatti WBS, Pugliesi R, Delai A, Antonini SR et al. SAT-LB067 Mutational Spectrum Determines Subtle Adrenal Biosynthetic Defect in Non-Classical Congenital Adrenal Hyperplasia Due to 21-Hydroxylase Deficiency. *JES*. 2019; 3(1 Suppl). Abstract. 101st Annual Meeting of the Endocrine Society. New Orleans, Louisiana. doi: 10.1210/js.2019-SAT-LB067

Mermejo LM, Elias Junior J, Saggioro FP, Tucci Jr S, Castro M, Moreira AC et al. Giant adrenal myelolipoma associated with 21-hydroxylase deficiency: unusual association mimicking an androgen-secreting adrenocortical carcinoma. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2010;54(4):419-24. doi:10.1590/S0004-27302010000400012

Miller WL. Gene conversions, deletions, and polymorphisms in congenital adrenal hyperplasia. *Am J Hum Genet*. 1988; 42(1):4-7. PMID: 3276177; PMCID: PMC1715342.

Miranda MC, Haddad LBP, Madureira G, Mendonca BB, Bachega TASS. Adverse Outcomes and Economic Burden of Congenital Adrenal Hyperplasia Late Diagnosis in the Newborn Screening Absence. *J Endocr Soc*. 2019;4(2):bvz013. doi: 10.1210/jendso/bvz013.

Miranda MC, Haddad LBP, Trindade E, Cassenote A, Hayashi GY, Damiani D et al. The cost-effectiveness of Congenital Adrenal Hyperplasia Newborn Screening in Brazil: a comparison between screened and unscreened cohorts. *Frontiers in Pediatrics*. 2021;9:1-12. doi: 10.3389/fped.2021.659492oi.

Mooji CF, Krouse JM, Claahsen-van der Grinten HL, Tack CJ, Hermus ARMM. Unfavourable trends in cardiovascular and metabolic risk in paediatric and adult patients with congenital adrenal hyperplasia? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;73(2):137-46. doi: 10.1111/j.1365-2265.2009.03690.x.

Moreira AC, Antonini SR, Castro M. Mechanisms in Endocrinology: A sense of time of the glucocorticoid circadian clock: from the ontogeny to the diagnosis of Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2018;179(1):r1-18. doi: 10.1530/EJE-18-0102.

Moreira AC, Elias LL. Pituitary-adrenal responses to corticotropin-releasing hormone in different degrees of adrenal 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;74(1):198-203. doi: 10.1210/jcem.74.1.1309366.

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*. 2013;80(2):111-8. doi: 10.1159/000353762.

Moreira RPP, Gomes LG, Mendonca BB, Bachega TASS. Impact of glucocorticoid receptor gene polymorphisms on the metabolic profile of adult patients with the classical form of 21-hydroxylase deficiency. *PLoS One*. 2012;7(9):e44893. doi: 10.1371/journal.pone.0044893.

Morel Y, Bristow J, Gitelman SE, Miller WL. Transcript encoded on the opposite strand of the human steroid 21-hydroxylase/complement component C4 gene locus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86(17):6582-6. doi: 10.1073/pnas.86.17.6582.

Moura-Massari VO, Bugano DDG, Marcondes JAM, Gomes LG, Mendonca BB, Bachega TASS. CYP21A2 genotypes do not predict the severity of hyperandrogenic manifestations in the nonclassical form of congenital adrenal hyperplasia. *Horm Metab Res*. 2013;45(4):301-7. doi: 10.1055/s-0032-1330007.

Muthusamy K, Elamin MB, Smushkin G, Murad MH, Lampropoulos JF, Elamin KB, et al. Clinical review: Adult height in patients with congenital adrenal hyperplasia: a systematic review and metaanalysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(9):4161-72. doi: 10.1210/jc.2009-2616.

Myers GL, Rifai N, Tracy RP, Roberts WL, Alexander RW, Biasucci LM, et al. CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: Report From the Laboratory Science Discussion Group. 2004. *Circulation*. 2004;110(25):e545-9. doi: 10.1161/01.CIR.0000148980.87579.5E.

Nordenström A, Falhammar H. Management of Endocrine Disease: Diagnosis and management of the patient with non-classic CAH due to 21-hydroxylase deficiency. *Eur J Endocrinol*, 2019;180(3):127-45. doi: 10.1530/EJE-18-0712.

Oliveira DM, Tura A, Vasques ACJ, Camilo DF, Lima MM, Lemos-Marini SHV et al. Insulin Resistance in Congenital Adrenal Hyperplasia is Compensated for by

Reduced Insulin Clearance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021;106(4):e1574-e1585. doi: 10.1210/clinem/dgab010.

Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ.* 2007;85(9):660-7. doi: 10.2471/blt.07.043497.

O'Shaughnessy PJ, Antignac JP, Le Bizec B, Morvan ML, Svechnikov K, Söder O, et al. Alternative (backdoor) androgen production and masculinization in the human fetus. *PLoS Biol.* 2019;17(2):e3000002. doi: 10.1371/journal.pbio.3000002.

Paizoni L, Auer MK, Schmidt H, Hübner A, Bidlingmaier M, Reisch N. Effect of androgen excess and glucocorticoid exposure on metabolic risk profiles in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Steroid Biochem. Mol Biol.* 2020;197:105540. doi:10.1016/j.jsbmb.2019.105540.

Parente, L. Deflazacort: therapeutic index, relative potency and equivalent doses versus other corticosteroids. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2017;5;18(1):1. doi: 10.1186/s40360-016-0111-8

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. doi: 10.1055/s-2007-1001755.

Reisch N, Arlt W, Krone N. Health problems in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Horm Res Paediatr.* 2011;76(2):73-85. doi: 10.1159/000327794

Rodrigues TMB, Barra CB, Santos JLS, Goulart EMA, Matos Ferreira AVM, Silva IN. Cardiovascular risk factors and increased carotid intima-media thickness in young patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Arch Endocrinol Metab.* 2015;59(6):541-7. doi: 10.1590/2359-3997000000119

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. doi: 10.1210/jc.2006-1711.

Seraphim CE, Frassei JS, FM Pessoa S, Scalco RC, Miranda MC, Madureira G. et al. Impact of Long-Term Dexamethasone Therapy on the Metabolic Profile of Patients With 21-Hydroxylase Deficiency. *J Endocrine Society.* 2019; 3(8):1574-82.

Sethi, JK, Hotamisligil GS. Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. *Nature Metabolism.* 2021;3(10):1302-12. doi: 10.1038/s42255-021-00470-z.

Shaw G, Fenelon J, Sichlau M, Auchus RJ, Wilson JD, Renfree MB. Role of the alternate pathway of dihydrotestosterone formation in virilization of the Wolffian

ducts of the tammar wallaby, *Macropus eugenii*. *Endocrinology*. 2006;147(5):2368-73. doi: 10.1210/en.2005-1251.

Shea JL, King MT, Yi Y, Gulliver W, Sun G. Body fat percentage is associated with cardiometabolic dysregulation in BMI-defined normal weight subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012;22(9):741-7. doi: 10.1016/j.numecd.2010.11.009.

Smeets EEJW, Span PN, van Herwaarden AE, Wevers RA, Hermus ARMM et al. Molecular characterization of testicular adrenal rest tumors in congenital adrenal hyperplasia: lesions with both adrenocortical and Leydig cell features. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(3):e524-30. doi: 10.1210/jc.2014-2036.

Sociedade Brasileira de Pediatria – Departamento de Nutrologia. *Obesidade na infância e adolescência. Manual de Orientação*. 3 ed. – São Paulo, SP; 2019. 236 p. Disponível em:
https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/Manual_de_Obesidade_-_3a_Ed_web_compressed.pdf

Sociedade Brasileira de Pediatria. *Dislipidemia na criança e no adolescente - Orientações para o pediatra. Guia prático de atualização*. Departamento Científico de Endocrinologia (2019-2021). 2020;(8):1-13. Disponível em:
https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/22336c-GPA_-_Dislipidemia_Crianca_e_Adoles.pdf

Souza LL et al. Definições Antropométricas da Obesidade. In: Mancini MC, Geloneze B, Sales JEN, Lima JG, Carra MK. *Tratado de obesidade*. 2. ed. Guanabara Koogan. 2015. Cap 2:52-68.

Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, Baskin LS, Conway GS, Merke DP. et al. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(11):4043-88. doi: 10.1210/jc.2018-01865.

Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT et al. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest*. 1992;90(2):584-95. doi: 10.1172/JCI115897.

Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med*. 2003;349(8):776-88.

Spritzer P, Billaud L, Thalabard JC, Birman P, Mowszowicz I, Raux-Demay MC et al. Cyproterone acetate versus hydrocortisone treatment in late-onset adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;70(3):642-6. doi: 10.1210/jcem-70-3-642.

Stepito NK, Cassar S, Joham AE, Hutchison SK, Harrison CL, Goldstein RF et al. Women with polycystic ovary syndrome have intrinsic insulin resistance on euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp. *Hum Reprod*. 2013;28(3):777-84. doi: 10.1093/humrep/des463.

Tagi VM, Giannini C, Chiarelli F. Insulin Resistance in Children. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;4(10):342. doi: 10.3389/fendo.2019.00342

Tamhane S, Rodriguez-Gutierrez R, Iqbal AM, Prokop LJ, Bancos, Speiser PW et al. Cardiovascular and Metabolic Outcomes in Congenital Adrenal Hyperplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(11):4097-103. doi: 10.1210/jc.2018-01862.

Torres N, Mello MP, Germano CMR, Elias LLK, Moreira AC, Castro M. Phenotype and genotype correlation of the microconversion from the CYP21A1P to the CYP21A2 gene in congenital adrenal hyperplasia. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(10):1311-8. doi 10.1590/S0100-879X2003001000006

Turcu AF, Auchus RJ. The next 150 years of congenital adrenal hyperplasia. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015;153:63-71. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.05.013.

Ubertini G, Bizzarri C, Grossi A, Gimigliano F, Ravà L, Fintini D et al. Blood pressure and left ventricular characteristics in young patients with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Int J Pediatr Endocrinol*. 2009;(2):383610. doi: 10.1155/2009/383610.

Vieira JGH, Furlanetto RP, Russo EMK, Noguti KO, Chacra AR. Radioimunoensaio do sulfato de dehidroepiandrosterona: metodologia e padronização de valores normais. *Arq Bras Endocrinol Metab* 1980;24:79-83.

Vieira JGH, Russo EMK, Germek OA, Antunes LAN. Método radioimunológico para a dosagem de cortisol sérico. *Rev Bras Patol Clin*. 1979;15(3):125-30.

Vieira JGH, Russo EMK, Maciel RMB, Germek OA. Desenvolvimento de um método radiológico simples para dosagem de androstenediona no soro. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 1981;25:47-50.

White PC, Bachega TA. Congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency: from birth to adulthood. *Semin Reprod Med*. 2012;30(5):400-9. doi: 10.1055/s-0032-1324724.

Whittle E, Falhammar H. Glucocorticoid Regimens in the Treatment of Congenital Adrenal Hyperplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Endocr Soc*. 2019;3(6)1227-45. doi: 10.1210/js.2019-00136.

Williams B, Mancia G, Spiering W, Rosei EA, Azizi M, Burnier M et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2018;36(10):1953-2041. doi: 10.1097/HJH.0000000000001940.

Wong Y, Tse H. Circulating Biomarkers for Cardiovascular disease risk prediction in patients with cardiovascular disease. *Front. Cardiovasc. Med.* 2021;8:713191. doi: 10.3389/fcvm.2021.713191

Yaribeygi H, Farrokhi FR, Butler AE, Sahebkar A. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *J Cell Physiol.* 2019;234(6):8152-61. doi: 10.1002/jcp.27603.

Yoon JY, Cheon CK. Genotype and clinical outcomes in children with congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Int.* 2021; 63(6):658-63. doi: 10.1111/ped.14478.

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.* 2010;38(2):260-5. doi: 10.1007/s12020-010-9382-9.

Zimmet P, Alberti KGM, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S et al. The metabolic syndrome in children and adolescents - na IDF consensus report. *Pediatr Diabetes.* 2007;8(5):299-306. doi: 10.1111/j.1399-5448.2007.00271.x.

APÊNDICE 1
Formulário de registros da avaliação clínica

PESQUISA: Avaliação dos fatores de risco cardiometabólicos na Forma Não Clássica da Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da 21-hidroxilase

Pesquisadores: Ariane Delai, Profa. Dra. Livia Mara Mermejo, Prof. Dr. Ayrton Custódio Moreira.

Paciente: _____

Registro: _____ Data: _____

Antropometria:

| Peso | Altura | IMC | Abdome | Cervical | Quadril |
|------|--------|-----|--------|----------|---------|
| | | | | | |

| | PA 0' | PA 5' | PA 10' |
|----------|-------|-------|--------|
| DIREITO | | | |
| ESQUERDO | | | |

Bioimpedância:

| Âng | Capacit total | Reatância | Resist | MMagra | MGorda | Água Total | %água MM | TMB | IMC |
|-----|---------------|-----------|--------|--------|--------|------------|----------|-----|-----|
| | | | | | | | | | |

Laboratoriais: Lipidograma, glicemia de jejum, HB glicada, insulina basal, PCR ultrasensível, interleucina-6, TNF-alfa, leptina e adiponectina

Clamp euglicêmico hiperinsulinêmico

APÊNDICE 2
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Adulto. Grupo Condição Clínica

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Prof. Dr. Ayrton Custódio Moreira – CRM SP 16200. Email: acmoreir@fmrp.usp.br

Profa. Dra. Livia Mara Mermejo – CRM SP 116395. Email: liviamermejo@yahoo.com.br

Dra. Ariane Delai – CRM SP 178906. Email: arianedelai@usp.br

Fones: (16) 3602 2565 ou (16) 3602 2326 ou (45) 99929 4352

Você está sendo convidado (a) como voluntário(a) a participar do projeto de pesquisa “Avaliação dos fatores de risco cardiometabólicos na Forma Não Clássica da Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da 21-hidroxilase”.

Para isso, vamos esclarecer alguns pontos importantes. Você possui uma alteração na produção de hormônios nas glândulas adrenais (ou suprarrenais, localizadas sobre os rins) decorrente de um problema na ação de uma enzima. Isso atrapalha a produção de um hormônio, chamado CORTISOL, excesso de produção de alguns outros hormônios e o aumento do tamanho dessas glândulas, condição conhecida como HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA.

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar os riscos de complicações como obesidade, problemas do colesterol, pressão alta, diabetes, entre outros, em pessoas que possuem o problema adrenal. Então, vamos organizar sua participação no trabalho em DUAS ETAPAS:

Primeiro, será realizada a coleta de sangue em uma veia no braço, avaliação das medidas do seu corpo (peso, altura, medida do abdome e do quadril, pressão arterial), e um teste chamado *CLAMP*, em que você receberá um soro com glicose (açúcar) e outro com insulina (hormônio importante para manter os níveis de glicose normais no sangue), pelas veias do braço, para avaliar se você apresenta resistência à ação da insulina. Os riscos desses exames incluem: dor e sangramento no momento de realizar o procedimento de coleta de sangue, risco de hipoglicemia (diminuição da glicose no sangue) por infusão da insulina durante o *CLAMP* e necessidade de permanecer em jejum por um período aproximado de 12 a 14 horas (desde as 22 horas da noite anterior até o final da realização dos testes). Esses exames serão realizados em um setor na Enfermaria da Endocrinologia no Hospital das Clínicas, por médica pesquisadora capacitada e participante do projeto – Dra. Ariane Delai – CRM SP 178906, visando ao monitoramento e à redução de qualquer risco durante o procedimento.

Em um segundo momento, você irá realizar ultrassom das artérias do pescoço (carótidas) e exame de composição corporal (avalia a quantidade de músculo e gordura); o risco, nesse caso, seria uma incidência muito baixa de radiação (poucos raios advindos do aparelho) para o exame de composição corporal (menor do que um exame comum de Raios-X). Esses exames serão realizados por médicos radiologistas participantes da equipe do Hospital das Clínicas, nas dependências do hospital.

O benefício na participação deste trabalho é que você realizará uma avaliação clínica dos fatores de risco relacionados a doenças do coração e os resultados obtidos neste estudo serão publicados e poderão ajudar a melhorar o tratamento de pacientes no futuro. Você será sempre esclarecido sobre sua participação, antes e depois da pesquisa.

Você não terá nenhum custo para participar da pesquisa e seus dados pessoais serão mantidos em sigilo. Para diminuir a chance de o risco de ser identificado, cada participante receberá um número que identificará se ele pertence ao grupo clínico ou ao grupo controle, com a numeração arábica indicando a ordem de participação (Grupo Controle 1 a 70 e Grupo Clínico 1 a 70).

Não haverá ressarcimento das despesas que eventualmente se apresentem por participar desta pesquisa (por exemplo: transporte, alimentação). Conforme as leis vigentes no país, você tem direito à indenização caso ocorra algum dano identificado e comprovado proveniente da participação neste estudo.

Caso não deseje fazer parte ou queira desistir durante a realização da pesquisa, não haverá nenhum problema, e seu acompanhamento e tratamento continuarão da mesma forma.

Você poderá entrar em contato com os pesquisadores a qualquer momento para esclarecer quaisquer dúvidas sobre os exames e resultados. Por meio dos telefones: (16) 3602 2565 ou (16) 3602 2326 ou (45) 99929 4352, os participantes poderão ter acesso à pesquisadora 24 horas por dia.

Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo à legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Dessa forma, é necessário que, após leitura do texto acima, você concorde inteiramente com os termos e preencha e assine os campos abaixo, concordando livremente em participar do projeto.

É necessário que você assine duas vias deste termo. Uma via será arquivada no Hospital das Clínicas, sob responsabilidade dos pesquisadores, e outra via será entregue a você.

Este trabalho será avaliado pelo Comitê de Ética do Hospital. Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionarem pesquisas em seres humanos que são realizadas na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar da mesma. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto é localizado no subsolo do hospital e funciona de segunda a sexta-feira, das 8h às 17h, telefone de contato (016) 3602-2228.

Nome do participante: _____

Assinatura do participante _____

Data: _____

Assinatura da pesquisadora: _____ Data: _____

Ariane Delai – CRM SP 178906
Fones: (16) 3602 2565 ou (16) 3602 2326 ou (45) 99929 4352
Email: arianedelai@usp.br

APÊNDICE 3
Termo de Assentimento Livre e Esclarecido – Criança e Adolescente. Grupo
Condição Clínica

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Prof. Dr. Ayrton Custódio Moreira – CRM SP 16200. Email: acmoreir@fmrp.usp.br

Profa. Dra. Livia Mara Mermejo – CRM SP 116395. Email: liviamermejo@yahoo.com.br

Dra. Ariane Delai – CRM SP 178906. Email: arianedelai@usp.br

Fones: (16) 3602 2565 ou (16) 3602 2326 ou (45) 99929 4352

Gostaríamos de convidar você a participar como voluntário (a) da pesquisa **“Avaliação dos fatores de risco cardiometabólicos na Forma Não Clássica da Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da 21-hidroxilase”**. O motivo que nos leva a realizar esta pesquisa é que “você possui uma alteração na produção de hormônios nas glândulas adrenais (ou suprarrenais, localizadas sobre os rins) decorrente de um problema na ação de uma enzima. Isso atrapalha a produção de um hormônio, chamado CORTISOL, excesso de produção de alguns outros hormônios e o aumento do tamanho dessas glândulas, condição conhecida como “HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA”. Nesta pesquisa, pretendemos “avaliar os riscos de complicações como obesidade, problemas do colesterol, pressão alta, diabetes, entre outros, em pessoas que possuem o problema adrenal”.

Caso você concorde em participar, vamos organizar sua participação no trabalho em DUAS ETAPAS:

Primeiro, você realizará a coleta de sangue em uma veia no braço, avaliação das medidas do seu corpo (peso, altura, medida do abdome e do quadril, pressão arterial) e um teste chamado *CLAMP*, em que você receberá um soro com glicose (açúcar) e outro com insulina (hormônio importante para manter os níveis de glicose normais no sangue), pelas veias do braço, para avaliar se você apresenta resistência à ação da insulina. Os riscos desses exames incluem: dor e sangramento no momento de realizar o procedimento de coleta de sangue, risco de hipoglicemia por infusão da insulina durante o *CLAMP* e necessidade de permanecer em jejum por um período aproximado de 12 a 14 horas (desde as 22 horas da noite anterior até o final da realização dos testes). Esses exames serão realizados em um setor na Enfermaria da Endocrinologia no Hospital das Clínicas, por médica pesquisadora capacitada e participante do projeto – Dra. Ariane Delai – CRM SP 178906, visando ao monitoramento e à redução de qualquer risco durante o procedimento.

Em um segundo momento, você irá realizar ultrassom das artérias do pescoço (carótidas) e exame de composição corporal (avalia a quantidade de músculo e gordura); o risco, nesse caso, seria uma incidência muito baixa de radiação (poucos raios advindos do aparelho) para o exame de composição corporal (menor do que um exame comum de Raios-X). Esses exames serão realizados por médicos radiologistas participantes da equipe do Hospital das Clínicas, nas dependências do hospital.

O benefício na participação deste trabalho é que você realizará uma avaliação clínica dos fatores de risco relacionados a doenças do coração e os resultados obtidos neste estudo serão publicados e poderão ajudar a melhorar o tratamento de pacientes no futuro.

Para participar desta pesquisa, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. O responsável por você poderá retirar o consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento.

Você será sempre esclarecido sobre sua participação, antes e depois da pesquisa. Não haverá nenhum custo para participar da pesquisa e os seus dados pessoais serão mantidos em sigilo. Para diminuir a chance de o risco de ser identificado, cada participante

receberá um número que identificará se ele pertence ao grupo clínico ou ao grupo controle, com a numeração arábica indicando a ordem de participação (Grupo Controle 1 a 70 e Grupo Clínico 1 a 70).

Não haverá ressarcimento das despesas que eventualmente se apresentem por participar desta pesquisa (por exemplo: transporte, alimentação). Conforme as leis vigentes no país, você tem direito à indenização caso ocorra algum dano identificado e comprovado proveniente da participação neste estudo.

Caso não deseje fazer parte ou queira desistir durante a realização da pesquisa, não haverá nenhum problema, e seu acompanhamento e tratamento continuarão da mesma forma.

Você poderá entrar em contato com os pesquisadores a qualquer momento para esclarecer quaisquer dúvidas sobre os exames e resultados. Por meio dos telefones: (16) 3602 2565 ou (16) 3602 2326 ou (45) 99929 4352, os participantes poderão ter acesso à pesquisadora 24 horas por dia.

Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo à legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Dessa forma, é necessário que, após leitura do texto acima, você concorde inteiramente com os termos e preencha e assine os campos abaixo, concordando livremente em participar do projeto.

É necessário que você assine duas vias deste termo. Uma via será arquivada no Hospital das Clínicas, sob responsabilidade dos pesquisadores, e outra via será entregue a você.

Este trabalho será avaliado pelo Comitê de Ética do Hospital. Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto de um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionarem pesquisas em seres humanos que são realizadas na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar da mesma. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto é localizado no subsolo do hospital e funciona de segunda a sexta-feira, das 8h às 17h, telefone de contato (016) 3602-2228.

Nome do participante: _____

Assinatura do participante: _____

Data: _____

Assinatura da pesquisadora: _____ Data: _____

Ariane Delai – CRM SP 178906
Fones: (16) 3602 2565 ou (16) 3602 2326 ou (45) 99929 4352
Email: arianedelai@usp.br

APÊNDICE 4
**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Responsáveis. Grupo Condição
Clínica**

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Prof. Dr. Ayrton Custódio Moreira – CRM SP 16200. Email: acmoreir@fmrp.usp.br

Profa. Dra. Lívia Mara Mermejo – CRM SP 116395. Email: liviamermejo@yahoo.com.br

Dra. Ariane Delai – CRM SP 178906. Email: arianedelai@usp.br

Fones: (16) 3602 2565 ou (16) 3602 2326 ou (45) 99929 4352

O(A) menor _____, sob sua responsabilidade, está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Avaliação dos fatores de risco cardiometabólicos na Forma Não Clássica da Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da 21-hidroxilase”**. Para isso, vamos esclarecer alguns pontos importantes.

Ele possui uma alteração na produção de hormônios nas glândulas adrenais (ou suprarrenais, localizadas sobre os rins) decorrente de um problema na ação de uma enzima. Isso atrapalha a produção de um hormônio, chamado CORTISOL, excesso de produção de alguns outros hormônios e o aumento do tamanho dessas glândulas, condição conhecida como HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar os riscos de complicações como obesidade, problemas do colesterol, pressão alta, diabetes, entre outros, em comparação às pessoas que não possuem o problema adrenal. Então, vamos organizar a participação do(a) menor em DUAS ETAPAS:

Primeiro, será realizada a coleta de sangue em uma veia no braço, avaliação das medidas do seu corpo (peso, altura, medida do abdome e do quadril, pressão arterial), e um teste chamado *CLAMP*, em que ele(a) receberá um soro com glicose (açúcar) e outro com insulina (hormônio importante para manter os níveis de glicose normais no sangue), pelas veias do braço, para avaliar se ele(a) apresenta resistência à ação da insulina. Os riscos desses exames incluem: dor e sangramento no momento de realizar o procedimento de coleta de sangue, risco de hipoglicemia (diminuição da glicose no sangue) por infusão da insulina durante o *CLAMP* e necessidade de permanecer em jejum por um período aproximado de 12 a 14 horas (desde as 22 horas da noite anterior até o final da realização dos testes). Esses exames serão realizados em um setor na Enfermaria da Endocrinologia no Hospital das Clínicas, por médica pesquisadora capacitada e participante do projeto – Dra. Ariane Delai – CRM SP 178906, visando ao monitoramento e à redução de qualquer risco durante o procedimento.

Em um segundo momento, o(a) menor vai realizar ultrassom das artérias do pescoço (carótidas) e exame de composição corporal (avalia a quantidade de músculo e gordura); o risco, nesse caso, seria uma incidência muito baixa de radiação (poucos raios advindos do aparelho) para o exame de composição corporal, (menor do que um exame comum de Raios-X). Esses exames serão realizados por médicos radiologistas participantes da equipe do Hospital das Clínicas, nas dependências do hospital.

O benefício da participação do(a) menor neste trabalho é que ele realizará uma avaliação clínica dos fatores de risco relacionados a doenças do coração e os resultados obtidos neste estudo serão publicados e poderão ajudar a melhorar o tratamento de pacientes no futuro.

Você e ele(a) sempre serão esclarecidos sobre a participação, antes e depois da pesquisa. Você e ele(a) não terão nenhum custo para participar da pesquisa e os dados pessoais dele(a) serão mantidos em sigilo. Para diminuir a chance de o risco de ser identificado, cada menor receberá um número que identificará se ele(a) pertence ao grupo

clínico ou ao grupo controle, com a numeração arábica indicando a ordem de participação (Grupo Controle 1 a 70 e Grupo Clínico 1 a 70).

Não haverá ressarcimento das despesas que eventualmente o(a) menor apresente por participar desta pesquisa (por exemplo: transporte, alimentação). Conforme as leis vigentes no país, você e ele(a) têm direito à indenização caso ocorra algum dano identificado e comprovado proveniente da participação neste estudo.

Caso não deseje que o(a) menor faça parte ou queira que ele(a) desista de participar durante a realização da pesquisa, não haverá nenhum problema. O acompanhamento e tratamento dele(a) continuará da mesma forma.

Você e ele(a) poderão entrar em contato com os pesquisadores a qualquer momento para esclarecer quaisquer dúvidas sobre os exames e resultados. Por meio dos telefones: (16) 3602 2565 ou (16) 3602 2326 ou (45) 99929 4352, os participantes poderão ter acesso à pesquisadora 24 horas por dia.

Você poderá retirar o consentimento para a participação do(a) menor no estudo a qualquer momento.

Dessa forma, é necessário que, após leitura do texto acima, você concorde inteiramente com os termos e preencha e assine os campos abaixo, concordando com a participação do(a) menor para participar do projeto.

É necessário que você assine duas vias deste termo. Uma via será arquivada no Hospital das Clínicas, sob responsabilidade dos pesquisadores, e outra via será entregue a você.

Este trabalho será avaliado pelo Comitê de Ética do Hospital. Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionarem pesquisas em seres humanos que são realizadas na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar da mesma. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto é localizado no subsolo do hospital e funciona de segunda a sexta-feira, das 8h às 17h, telefone de contato (016) 3602-2228.

Nome do responsável legal: _____

Assinatura do responsável legal: _____

Data: _____

Assinatura da pesquisadora: _____ Data: _____

Ariane Delai – CRM SP 178906
Fones: (16) 3602 2565 ou (16) 3602 2326 ou (45) 99929 4352
Email: arianedelai@usp.br

APÊNDICE 5

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Adultos. Grupo Controle

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Prof. Dr. Ayrton Custódio Moreira – CRM SP 16200. Email: acmoreir@fmrp.usp.br

Profa. Dra. Lívia Mara Mermejo – CRM SP 116395. Email: liviamermejo@yahoo.com.br

Dra. Ariane Delai – CRM SP 178906. Email: arianedelai@usp.br

Fones: (16) 3602 2565 ou (16) 3602 2326 ou (45) 99929 4352

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar do projeto de pesquisa “Avaliação dos fatores de risco cardiometabólicos na Forma Não Clássica da Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da 21-hidroxilase”.

Para isso, vamos esclarecer alguns pontos importantes. O motivo que nos leva a realizar esta pesquisa é que estamos buscando avaliar se os pacientes que possuem um problema na produção de hormônios das glândulas adrenais (ou suprarrenais, localizadas sobre os rins), conhecido como HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA, apresentam maior risco de complicações como obesidade, problemas do colesterol, pressão alta, diabetes, entre outros, em comparação às pessoas que não possuem o problema adrenal. Para isso, precisamos também fazer uma avaliação em pessoas que não apresentem essa doença. Caso você concorde em participar, vamos organizar sua participação no trabalho em DUAS ETAPAS:

Primeiro, será realizada a coleta de sangue em uma veia no braço, avaliação das medidas do seu corpo (peso, altura, medida do abdome e do quadril, pressão arterial), e um teste chamado *CLAMP*, em que você receberá um soro com glicose (açúcar) e outro com insulina (hormônio importante para manter os níveis de glicose normais no sangue), pelas veias do braço, para avaliar se você apresenta resistência à ação da insulina. Os riscos desses exames incluem: dor e sangramento no momento de realizar o procedimento de coleta de sangue, risco de hipoglicemia (diminuição da glicose no sangue) por infusão da insulina durante o *CLAMP* e necessidade de permanecer em jejum por um período aproximado de 12 a 14 horas (desde as 22 horas da noite anterior até o final da realização dos testes). Esses exames serão realizados em um setor na Enfermaria da Endocrinologia no Hospital das Clínicas, por médica pesquisadora capacitada e participante do projeto – Dra. Ariane Delai – CRM SP 178906, visando ao monitoramento e à redução de qualquer risco durante o procedimento.

Em um segundo momento, você irá realizar ultrassom das artérias do pescoço (carótidas) e exame de composição corporal (avalia a quantidade de músculo e gordura); o risco, nesse caso, seria uma incidência muito baixa de radiação (poucos raios advindos do aparelho) para o exame de composição corporal, (menor do que um exame comum de Raios-X). Serão realizados por médicos radiologistas participantes da equipe do Hospital das Clínicas, nas dependências do hospital.

O benefício na participação deste trabalho é que você realizará uma avaliação clínica dos fatores de risco relacionados a doenças do coração e os resultados obtidos neste estudo serão publicados e poderão ajudar a melhorar o tratamento de pacientes no futuro.

Você será sempre esclarecido sobre sua participação, antes e depois da pesquisa. Você poderá entrar em contato com os pesquisadores a qualquer momento para esclarecer quaisquer dúvidas sobre os exames e resultados.

Você não terá nenhum custo para participar da pesquisa e seus dados pessoais serão mantidos em sigilo. Para diminuir a chance de o risco de ser identificado, cada participante receberá um número que identificará se ele pertence ao grupo clínico ou ao grupo controle, com a numeração arábica indicando a ordem de participação (Grupo Controle 1 a 70 e Grupo Clínico 1 a 70).

Não haverá ressarcimento das despesas que eventualmente apresente por participar desta pesquisa (por exemplo: transporte, alimentação). Conforme as leis vigentes no país, você tem direito à indenização caso ocorra algum dano identificado e comprovado proveniente da participação neste estudo.

Caso não deseje fazer parte ou queira desistir durante a realização da pesquisa, não haverá nenhum problema. O seu acompanhamento e tratamento no hospital continuarão da mesma forma.

Você poderá entrar em contato com os pesquisadores a qualquer momento para esclarecer quaisquer dúvidas sobre os exames e resultados. Por meio dos telefones: (16) 3602 2565 ou (16) 3602 2326 ou (45) 99929 4352, os participantes poderão ter acesso à pesquisadora 24 horas por dia.

Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo à legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Dessa forma, é necessário que, após leitura do texto acima, você concorde inteiramente com os termos e preencha e assine os campos abaixo, concordando livremente em participar do projeto.

É necessário que você assine duas vias deste termo. Uma via será arquivada no Hospital das Clínicas, sob responsabilidade dos pesquisadores, e outra via será entregue a você.

Este trabalho será avaliado pelo Comitê de Ética do Hospital. Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto de um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionarem pesquisas em seres humanos que são realizadas na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar da mesma. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto é localizado no subsolo do hospital e funciona de segunda a sexta-feira, das 8h às 17h, telefone de contato (016) 3602-2228.

Nome do participante: _____

Assinatura do participante _____

Data: _____

Assinatura da pesquisadora: _____ Data: _____

Ariane Delai – CRM SP 178906
Fones: (16) 3602 2565 ou (16) 3602 2326 ou (45) 99929 4352
Email: arianedelai@usp.br

APÊNDICE 6
Termo de Assentimento Livre e Esclarecido – Crianças e Adolescentes. Grupo Controle

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Prof. Dr. Ayrton Custódio Moreira – CRM SP 16200. Email: acmoreir@fmrp.usp.br

Profa. Dra. Livia Mara Mermejo – CRM SP 116395. Email: liviamermejo@yahoo.com.br

Dra. Ariane Delai – CRM SP 178906. Email: arianedelai@usp.br

Fones: (16) 3602 2565 ou (16) 3602 2326 ou (45) 99929 4352

Gostaríamos de convidar você a participar como voluntário (a) da pesquisa **“Avaliação dos fatores de risco cardiometabólicos na Forma Não Clássica da Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da 21-hidroxilase”**. O motivo que nos leva a realizar esta pesquisa é que estamos buscando avaliar se os pacientes que possuem um problema na produção de hormônios das glândulas adrenais (ou suprarrenais, localizadas sobre os rins), conhecido como HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA, apresentam maior risco de complicações como obesidade, problemas do colesterol, pressão alta, diabetes, entre outros, em comparação às pessoas que não possuem o problema adrenal. Para isso, precisamos também fazer uma avaliação em pessoas que não apresentem essa doença. Caso você concorde em participar, vamos organizar sua participação no trabalho em DUAS ETAPAS:

Primeiro, você realizará a coleta de sangue em uma veia no braço, avaliação das medidas do seu corpo (peso, altura, medida do abdome e do quadril, pressão arterial), e um teste chamado *CLAMP*, em que você receberá um soro com glicose (açúcar) e outro com insulina (hormônio importante para manter os níveis de glicose normais no sangue), pelas veias do braço, para avaliar se você apresenta resistência à ação da insulina. Os riscos desses exames incluem: dor e sangramento no momento de realizar o procedimento de coleta de sangue, risco de hipoglicemia (diminuição da glicose no sangue) por infusão da insulina durante o *CLAMP* e necessidade de permanecer em jejum por um período aproximado de 12 a 14 horas (desde as 22 horas da noite anterior até o final da realização dos testes). Esses exames serão realizados em um setor na Enfermaria da Endocrinologia no Hospital das Clínicas, por médica pesquisadora capacitada e participante do projeto – Dra Ariane Delai – CRM SP 178906, visando ao monitoramento e à redução de qualquer risco durante o procedimento.

Em um segundo momento, você irá realizar ultrassom das artérias do pescoço (carótidas) e exame de composição corporal (avalia a quantidade de músculo e gordura); o risco, nesse caso, seria uma incidência muito baixa de radiação (poucos raios advindos do aparelho) para o exame de composição corporal, (menor do que um exame comum de Raios-X). Esses exames serão realizados por médicos radiologistas participantes da equipe do Hospital das Clínicas, nas dependências do hospital.

O benefício na participação deste trabalho é que você realizará uma avaliação clínica dos fatores de risco relacionados a doenças do coração e os resultados obtidos neste estudo serão publicados e poderão ajudar a melhorar o tratamento de pacientes no futuro.

Para participar desta pesquisa, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. O responsável por você poderá retirar o consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento.

Você será sempre esclarecido sobre sua participação, antes e depois da pesquisa. Não haverá nenhum custo para participar da pesquisa e os seus dados pessoais serão mantidos em sigilo. Para diminuir a chance de o risco de ser identificado, cada participante receberá um número que identificará se ele pertence ao grupo clínico ou ao grupo controle,

com a numeração arábica indicando a ordem de participação (Grupo Controle 1 a 70 e Grupo Clínico 1 a 70).

Não haverá ressarcimento das despesas que eventualmente se apresentem por participar desta pesquisa (por exemplo: transporte, alimentação). Conforme as leis vigentes no país, você tem direito à indenização caso ocorra algum dano identificado e comprovado proveniente da participação neste trabalho.

Caso não deseje fazer parte ou queira desistir durante a realização da pesquisa, não haverá nenhum problema. O seu acompanhamento e tratamento no hospital continuarão da mesma forma.

Você poderá entrar em contato com os pesquisadores a qualquer momento para esclarecer quaisquer dúvidas sobre os exames e resultados. Por meio dos telefones: (16) 3602 2565 ou (16) 3602 2326 ou (45) 99929 4352, os participantes poderão ter acesso à pesquisadora 24 horas por dia.

Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo à legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Dessa forma, é necessário que, após leitura do texto acima, você concorde inteiramente com os termos e preencha e assine os campos abaixo, concordando livremente em participar do projeto.

É necessário que você assine duas vias deste termo. Uma via será arquivada no Hospital das Clínicas, sob responsabilidade dos pesquisadores, e outra via será entregue a você.

Este trabalho será avaliado pelo Comitê de Ética do Hospital. Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionarem pesquisas em seres humanos que são realizadas na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar da mesma. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto é localizado no subsolo do hospital e funciona de segunda a sexta-feira, das 8h às 17h, telefone de contato (016) 3602-2228.

Nome do participante: _____

Assinatura do participante: _____

Data: _____

Assinatura da pesquisadora: _____ Data: _____

Ariane Delai – CRM SP 178906
Fones: (16) 3602 2565 ou (16) 3602 2326 ou (45) 99929 4352
Email: arianedelai@usp.br

APÊNDICE 7

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Responsáveis. Grupo Controle

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Prof. Dr. Ayrton Custódio Moreira – CRM SP 16200. Email: acmoreir@fmrp.usp.br

Profa. Dra. Livia Mara Mermejo – CRM SP 116395. Email: liviamermejo@yahoo.com.br

Dra. Ariane Delai – CRM SP 178906. Email: arianedelai@usp.br

Fones: (16) 3602 2565 ou (16) 3602 2326 ou (45) 99929 4352

O(A) menor _____, sob sua responsabilidade, está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “**Avaliação dos fatores de risco cardiometabólicos na Forma Não Clássica da Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da 21-hidroxilase**”. Para isso, vamos esclarecer alguns pontos importantes.

O motivo que nos leva a realizar esta pesquisa é que estamos buscando avaliar se os pacientes que possuem um problema na produção de hormônios das glândulas adrenais (ou suprarrenais, localizadas sobre os rins), conhecido como HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA, apresentam maior risco de complicações como obesidade, problemas do colesterol, pressão alta, diabetes, entre outros, em comparação às pessoas que não possuem o problema adrenal. Para isso, precisamos também fazer uma avaliação em pessoas que não apresentem essa doença. Então, vamos organizar a participação do menor em DUAS ETAPAS:

Primeiro, será realizada a coleta de sangue em uma veia no braço, avaliação das medidas do corpo do menor (peso, altura, medida do abdome e do quadril, pressão arterial), e um teste chamado *CLAMP*, em que ele(a) receberá um soro com glicose (açúcar) e outro com insulina (hormônio importante para manter os níveis de glicose normais no sangue), pelas veias do braço, para avaliar se ele(a) apresenta resistência à ação da insulina. Os riscos desses exames incluem: dor e sangramento no momento de realizar o procedimento de coleta de sangue, risco de hipoglicemia (diminuição da glicose no sangue) por infusão da insulina durante o *CLAMP* e necessidade de permanecer em jejum por um período aproximado de 12 a 14 horas (desde as 22 horas da noite anterior até o final da realização dos testes). Esses exames serão realizados em um setor na Enfermaria da Endocrinologia no Hospital das Clínicas, por médica pesquisadora capacitada e participante do projeto – Dra Ariane Delai – CRM SP 178906, visando ao monitoramento e à redução de qualquer risco durante o procedimento.

Em um segundo momento, ele(a) vai realizar ultrassom das artérias do pescoço (carótidas) e exame de composição corporal (avalia a quantidade de músculo e gordura); o risco, nesse caso, seria uma incidência muito baixa de radiação (poucos raios advindos do aparelho) para o exame de composição corporal (menor do que um exame comum de Raios-X). Esses exames serão realizados por médicos radiologistas participantes da equipe do Hospital das Clínicas, nas dependências do hospital.

O benefício da participação do menor neste trabalho é que ele passará por uma avaliação clínica dos fatores de risco relacionados a doenças do coração e os resultados obtidos neste estudo serão publicados e poderão ajudar a melhorar o tratamento de pacientes no futuro.

Você e ele(a) serão sempre esclarecidos sobre a participação, antes e depois da pesquisa. Você e ele(a) não terão nenhum custo para participar da pesquisa e os dados pessoais dele(a) serão mantidos em sigilo. Para diminuir a chance do risco de ser identificado cada menor receberá um número que identificará se ele pertence ao grupo clínico ou ao grupo controle, com a numeração arábica indicando a ordem de participação (Grupo Controle 1 a 70 e Grupo Clínico 1 a 70).

Não haverá ressarcimento das despesas que eventualmente o(a) menor tenha por participar desta pesquisa (por exemplo: transporte, alimentação). Conforme as leis vigentes no país, ele(a) tem direito à indenização caso ocorra algum dano identificado e comprovado proveniente da participação neste estudo.

Caso não deseje que ele(a) faça parte ou queira que ele(a) desista de participar durante a realização da pesquisa, não haverá nenhum problema. O acompanhamento e o tratamento dele(a) continuarão da mesma forma.

Você e ele(a) poderão entrar em contato com os pesquisadores a qualquer momento para esclarecer quaisquer dúvidas sobre os exames e resultados. Por meio dos telefones: (16) 3602 2565 ou (16) 3602 2326, os participantes poderão ter acesso à pesquisadora 24 horas por dia.

Você poderá retirar o consentimento para a participação do(a) menor no estudo a qualquer momento.

Dessa forma, é necessário que, após leitura do texto acima, você concorde inteiramente com os termos e preencha e assine os campos abaixo, concordando com a participação do(a) menor livre e esclarecida para participar do projeto.

É necessário que você assine duas vias deste termo. Uma via será arquivada no Hospital das Clínicas, sob responsabilidade dos pesquisadores, e outra via será entregue a você.

Este trabalho será avaliado pelo Comitê de Ética do Hospital. Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto de um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionarem pesquisas em seres humanos que são realizadas na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar da mesma. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto é localizado no subsolo do hospital e funciona de segunda a sexta-feira, das 8h às 17h, telefone de contato (016) 3602-2228.

Nome do responsável legal: _____

Assinatura do responsável legal: _____

Data: _____

Assinatura da pesquisadora: _____ Data: _____

Ariane Delai – CRM SP 178906
Fones: (16) 3602 2565 ou (16) 3602 2326
E-mail: arianedelai@usp.br

ANEXO 1

Clamp Euglicêmico-Hiperinsulinêmico. Protocolo Padrão – Adaptado do Limed/Unicamp. Laboratório de Diabetes e Metabolismo – HC/FMRP/USP

| *Standard Operating Procedure*



CLAMP EUGLICÊMICO-HIPERINSULINÊMICO

O clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico é o método padrão-ouro para investigar e quantificar a resistência a insulina. É chamado assim, pois ele estima a glicose necessária para compensar um aumento no nível plasmático de insulina, sem causar hipoglicemia. O objetivo deste tipo de clamp é aumentar a concentração de insulina plasmática agudamente a um novo platô e mantê-la neste nível, e manter a glicemia constante durante a perfusão de insulina¹.

PREPARO DA SALA: no dia anterior

1. Verificar glucose analyzer → colocar em modo RUN, usar padrão 9g/l para dosar e observar resultado – deverá ser entre 8,55 e 9,54 g/l
2. Verificar as baterias das duas bombas de infusão
3. Arrumar cama
4. Arrumar bandejas com tubos para sangue. Tempos: -30, 0(2 tubos), 30, 60(2 tubos), 90(2 tubos), 120(2 tubos), 150, 180(2 tubos).

ANTES DA CHEGADA DO PACIENTE:

1. Montar manta térmica: com espuma e fronha; ligar na tomada para aquecimento prévio
2. Montar mesa de material de punção venosa (abocath, torneira de três vias, gaze, algodão, álcool, esparadrapo, seringas)
3. Verificar material a ser utilizado (seringas, tubos, eppendorfs, isopor com gelo, insulina, heparina etc)
4. Abrir check-list, ficha do clamp e gráfico.

INÍCIO DO EXAME:

O paciente deverá receber, anteriormente ao agendamento do seu exame, as informações necessárias. Deverá estar em jejum de 12 horas. O horário de chegada do paciente é as 7:00hs.

1. Pesar, medir a altura, medir circunferências do pescoço, cintura, quadril e coxa
2. Urinar



3. Após, o paciente deverá ser convidado a deitar e relaxar por 5 minutos, antes de fazer o teste de boimpedância, conforme protocolo.
4. Colocar a mão onde será feito o acesso venoso em manta térmica ligada para arterialização do sangue.
5. Punção do acesso venoso: serão dois acessos venosos, preferencialmente no mesmo braço. O primeiro deverá ser na veia da dobra do braço (antecubital) para infusão. Será colocado uma torneira de três vias. Neste acesso serão infundidos glicose e insulina através de bombas de infusão.
6. O segundo acesso venoso será feito próximo ao punho em posição retrógrada, para coleta de sangue, onde também será colocada uma torneira de três vias.
7. Coletar tempo (-30) e dosar 1ml de sangue no glucose para avaliar glicemia
8. Preparo das bombas de infusão:

- Bomba de glicose: Acoplar soro glicosado a 10% no suporte de soro, montar equipo e conectar no acesso de 3 vias da veia da dobra do braço.

Programar a bomba para infundir de 1 a 3 ml/h, dependendo do caso.

- Bomba de insulina: coletar 4 ml de sangue do paciente;

- ❖ Calcular a dose de insulina:

$$\frac{[(40\text{mU}/\text{m}^2 \cdot \text{min} \times \text{ASC} \times \text{Vol da seringa}\{50\text{ml}\})/0,19]/1000}$$

Onde **ASC** = área da superfície corporal

- ❖ Na seringa de 50 ml, colocar:

- 46 ml - soro fisiológico
- 4ml de sangue
- + insulina.

Retirar o ar e colocar o extensor. Montar a seringa na bomba.
Conectar equipo ao acesso de 3 vias da veia da dobra do braço.

Programar a bomba pra infundir 45,6ml/h, nos primeiros 4 minutos.

9. Iniciar as coleta basais:

| *Standard Operating Procedure*

- Tempo 0: 2 tubos vermelhos – 8 ml em cada, para dosagem basal (perfil hepático, lipídico, glicemia, insulina, hematócrito)
 - 1 *ependorf* para dosar glicemia no glucose – 1ml
10. Zerar cronômetros e iniciar infusão, dando *start* nas duas bombas.
11. Após 4 minutos, diminuir a velocidade de infusão de insulina para 22,8 ml/h
12. Após 7 minutos, diminuir a velocidade de infusão de insulina para 11,4 ml/h
13. Tempos de coleta:

| Tempo (min) | Volume (ml) | n. e tipo de tubo | Dosagens |
|-------------|-------------|-----------------------|---------------------|
| 0 | 1+16 | 1 ml no ependorf | Glicemia |
| | | 8 ml e 2 tubos (16ml) | Soro para hormônios |
| 10 | 1 | 1 ependorf | Glicemia |
| 15 | 1 | 1 ependorf | Glicemia |
| 20 | 1 | 1 ependorf | Glicemia |
| 25 | 1 | 1 ependorf | Glicemia |
| 30 | 1 | 1 ependorf | Glicemia |
| 35 | 1 | 1 ependorf | Glicemia |
| 40 | 1 | 1 ependorf | Glicemia |
| 45 | 1 | 1 ependorf | Glicemia |
| 50 | 1 | 1 ependorf | Glicemia |
| 55 | 1 | 1 ependorf | Glicemia |
| 60 | 1+16 | 1 ml no ependorf | Glicemia |
| | | 8 ml e 2 tubos (16ml) | Soro para hormônios |
| 65 | 1 | 1 ependorf | Glicemia |
| 70 | 1 | 1 ependorf | Glicemia |
| 75 | 1 | 1 ependorf | Glicemia |
| 80 | 1 | 1 ependorf | Glicemia |
| 85 | 1 | 1 ependorf | Glicemia |

| *Standard Operating Procedure*

| | | | |
|-----|------|-----------------------|---------------------|
| 90 | 1+16 | 1 ml no eppendorf | Glicemia |
| | | 8 ml e 2 tubos (16ml) | Soro para hormônios |
| 95 | 1 | 1 eppendorf | Glicemia |
| 100 | 1 | 1 eppendorf | Glicemia |
| 105 | 1 | 1 eppendorf | Glicemia |
| 110 | 1 | 1 eppendorf | Glicemia |
| 115 | 1 | 1 eppendorf | Glicemia |
| 120 | 1+16 | 1 ml no eppendorf | Glicemia |
| | | 8 ml e 2 tubos (16ml) | Soro para hormônios |
| 125 | 1 | 1 eppendorf | Glicemia |
| 130 | 1 | 1 eppendorf | Glicemia |
| 135 | 1 | 1 eppendorf | Glicemia |
| 140 | 1 | 1 eppendorf | Glicemia |
| 145 | 1 | 1 eppendorf | Glicemia |
| 150 | 1+16 | 1 ml no eppendorf | Glicemia |
| | | 8 ml e 2 tubos (16ml) | Soro para hormônios |
| 155 | 1 | 1 eppendorf | Glicemia |
| 160 | 1 | 1 eppendorf | Glicemia |
| 165 | 1 | 1 eppendorf | Glicemia |
| 170 | 1 | 1 eppendorf | Glicemia |
| 175 | 1 | 1 eppendorf | Glicemia |
| 180 | 1+16 | 1 ml no eppendorf | Glicemia |
| | | 8 ml e 2 tubos (16ml) | Soro para hormônios |



INSULINIZAÇÃO DE VOLUNTÁRIOS DIABÉTICOS TIPO 2:

| GLICEMIA | PROCEDIMENTO |
|-----------------------|--|
| < 150 mg/dl | Iniciar clamp sem infusão de glicose, à partir do prime de insulina (45,6 – 22,8 – 11,4). |
| Entre 150 e 200 mg/dl | Infusão EV de 0,5 UI/Kg de insulina em bolus e dosar glicemia de 15 em 15 minutos. |
| | Iniciar clamp após 30min – 1h se o nível da glicemia estiver < 150 mg/dl. |
| | Se após 30-45 minutos a glicemia estiver acima de 160-170 mg/dl (e não apresentar queda aparente), infusão de novo bolus de 0,5 UI/kg. |
| >200 mg/dl | Eutrófico/Sobrepeso: infusão EV de 0,7UI/kg de insulina Obeso: infusão EV de 1,0 UI/kg de insulina. |
| | Se após 30 minutos o nível da glicemia não apresentar um decréscimo de ≥ 50 mg/dl e estiver entre 160-170mg/dl, realizar a infusão de 0,5UI/kg de insulina. |

TÉRMINO DO EXAME:

1. Desligar a bomba de infusão de insulina
2. Oferecer o almoço para o paciente
3. Observar estabilização da glicemia do paciente
4. Entregar isopor com tubos de sangue para laboratório
5. Colocar o *glucose analyzer* em stand by
6. Arrumar sala: jogar material utilizado em lixo apropriado, tirar roupa de cama e colocar no hamper
7. Colocar espuma da manta térmica para secar.



INSULINIZAÇÃO DE VOLUNTÁRIOS DIABÉTICOS TIPO 2:

| GLICEMIA | PROCEDIMENTO |
|-----------------------|---|
| < 150 mg/dl | Iniciar clamp sem infusão de glicose, à partir do prime de insulina (45,6 – 22,8 – 11,4). |
| Entre 150 e 200 mg/dl | Infusão EV de 0,5 UI/Kg de insulina em bolus e dosar glicemia de 15 em 15 minutos. |
| | Iniciar clamp após 30min – 1h se o nível da glicemia estiver < 150 mg/dl. Se após 30-45 minutos a glicemia estiver acima de 160-170 mg/dl (e não apresentar queda aparente), infusão de novo bolus de 0,5 UI/kg. |
| >200 mg/dl | Eutrófico/Sobrepeso: infusão EV de 0,7UI/kg de insulina Obeso: infusão EV de 1,0 UI/kg de insulina. |
| | Se após 30 minutos o nível da glicemia não apresentar um decréscimo de ≥ 50 mg/dl e estiver entre 160-170mg/dl, realizar a infusão de 0,5UI/kg de insulina. |

TÉRMINO DO EXAME:

1. Desligar a bomba de infusão de insulina
2. Oferecer o almoço para o paciente
3. Observar estabilização da glicemia do paciente
4. Entregar isopor com tubos de sangue para laboratório
5. Colocar o *glucose analyzer* em *stand by*
6. Arrumar sala: jogar material utilizado em lixo apropriado, tirar roupa de cama e colocar no hamper
7. Colocar espuma da manta térmica para secar.



LISTA DE MATERIAIS PARA O CLAMP

Materiais descartáveis:

- 1 jogo de roupa de cama
- 1 fronha extra
- Etiquetas
- Tubos (LIMED: 8 vermelhos; Lab. Franceschi: 5 vermelhos; Lab. UNICAMP: 1 basal)
- 2 abocaths
- Esparadrapo
- Luvas
- 2 torneira de 3 vias
- Seringas
 - ❖ 5mL → ±40 unidades
 - ❖ 10ml → ± 4 unidades e
 - ❖ 20ml → ± 6 unidades
- Garrote
- Bolas de algodão
- Gaze
- 1 Seringa de 50ml
- 1 Extensor do equipo
- 2 Equipos para as bombas de infusão
- 1 agulha 40x12
- 1 seringa 1ml
- SF 100ml → 2u de 100ml cada
- SG10% → 1000ml
- Insulina
- Ficha gráfico
- Etiqueta
- Espuma para manta térmica

**Material permanente**

- Manta térmica
- Suporte de soro
- Mesa auxiliar
- Bandeja
- Cuba redonda
- 2 cronômetros
- Escada
- Cesto de lixo
- Travesseiro
- Extensão elétrica para manta térmica

Referências:

1. DeFronzo R, Tobin J, Andres R (1979). "Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance". *Am J Physiol* 237 (3): E214–23.

ANEXO 2

Formulário de Registro - *Clamp* Euglicêmico-Hiperinsulinêmico



PROTOCOLO – CLAMP EUGLICÊMICO-HIPERINSULINÊMICO

Nome: _____ Idade: _____ Data da Avaliação: ____/____/____ HC: _____
 ADA: () NGT () IGT () DM2 () normal Peso: _____ Estatura: _____ IMC: _____ %GC: _____ MM (kg): _____

| CALCULOS | | | |
|--|---------------------|------------------|---------------------|
| Infusão cte – 1mU/kg.min ou 40mU/m ² .min | | | |
| Solução de Insulina R _____ UI + 4ml sangue + 46ml SF 0,9% | | | |
| 0 – 4' = 45,6 ml/h | | | |
| 4 – 7' = 22,8 ml/h | | | |
| 7 – 180' = 11,4 ml/h | | | |
| GIR (mig.kg.min) | Ajuste Bomba (ml/h) | GIR (mig.kg.min) | Ajuste Bomba (ml/h) |
| 0,5 | | 7,0 | |
| 1,0 | | 7,5 | |
| 1,5 | | 8,0 | |
| 2,0 | | 8,5 | |
| 2,5 | | 9,0 | |
| 3,0 | | 9,5 | |
| 3,5 | | 10,0 | |
| 4,0 | | 10,5 | |
| 4,5 | | 11,0 | |
| 5,0 | | 11,5 | |
| 5,5 | | 12,0 | |
| 6,0 | | 12,5 | |
| 6,5 | | 13,0 | |

| Tempo (hora:min) | Glicemia (mg/dl) | Ajuste (hora:min) | GIR (mg.kg ⁻¹ .min ⁻¹) |
|------------------|------------------|-------------------|---|
| -01:00 | | | |
| -00:30 | | | |
| 00:00 | | | |
| 00:04 | | | |
| 00:07 | | | |
| 00:10 | | | |
| 00:15 | | | |
| 00:20 | | | |
| 00:25 | | | |
| 00:30 | | | |
| 00:35 | | | |
| 00:40 | | | |
| 00:45 | | | |
| 00:50 | | | |
| 00:55 | | | |
| 01:00 | | | |
| 01:05 | | | |
| 01:10 | | | |
| 01:15 | | | |
| 01:20 | | | |
| 01:25 | | | |
| 01:30 | | | |
| 01:35 | | | |
| 01:40 | | | |
| 01:45 | | | |
| 01:50 | | | |

| Tempo (hora:min) | Glicemia (mg/dl) | Ajuste (hora:min) | GIR (mg.kg ⁻¹ .min ⁻¹) |
|------------------|------------------|-------------------|---|
| 01:55 | | | |
| 02:00 | | | |
| 02:05 | | | |
| 02:10 | | | |
| 02:15 | | | |
| 02:20 | | | |
| 02:25 | | | |
| 02:30 | | | |
| 02:35 | | | |
| 02:40 | | | |
| 02:45 | | | |
| 02:50 | | | |
| 02:55 | | | |
| 03:00 | | | |

| Resultados: | | M (mmol) M/mm |
|-------------|-------|---------------|
| Insulina | HbA1c | |
| 0 _____ | _____ | |
| 30 _____ | | 60-120 _____ |
| 60 _____ | | 80-120 _____ |
| 90 _____ | | 120-180 _____ |
| 120 _____ | | 150-180 _____ |
| 150 _____ | | |
| 180 _____ | | |

ANEXO 3
Autorização da Pesquisa no HC/FMRP/USP



PROJETO DE PESQUISA



Ribeirão Preto, 30 de MAIO de 2018.

Ilustríssima Senhora
Prof.ª Dr.ª Márcia Guimarães Villanova
MD.Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Do HCFMRP e da FMRP-USP

Senhora Coordenadora,

Encaminho em anexo o projeto de pesquisa intitulado AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO CARDIO-METABÓLICOS NA FORMA NÃO-CLÁSSICA DA HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA POR DEFICIÊNCIA DA 21 HIDROXILASE, juntamente com a documentação necessária para avaliação ética deste Comitê.

O projeto de pesquisa acima mencionado será desenvolvido no departamento de DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA.

Informo também que o pesquisador responsável e orientador possuem currículo Lattes.

O orçamento do presente projeto foi analisado pela equipe técnica da UPC antes da submissão ao Comitê e foi APROVADO.

Atenciosamente,

AYRTTON CUSTÓDIO DE ALMEIDA
Médico
CREMESP 16200

ARIANE DELAI

De acordo:

DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA
Carimbar e Assinar
Prof. Dr. Paulo Lonzada Júnior
Suplente da Chefia do
Departamento de Clínica Médica

Chefe do Ambulatório/Laboratório
Carimbar e Assinar

Prof.ª Dr.ª Lda M. Z. Maciel
Divisão de Endocrinologia
CRM 26771



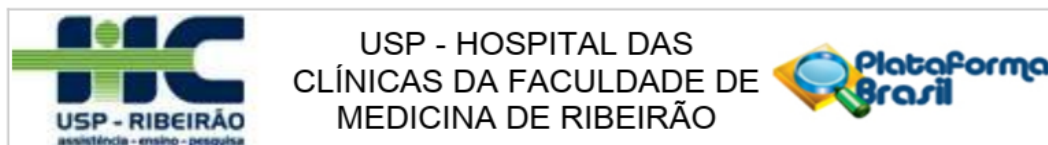
Obs.: Caso algum chefe possua vínculo com a pesquisa, deverá ser solicitada assinatura do suplente.
Após assinatura em todos os campos, digitalizar toda a documentação do check list e encaminhar ao CEP via Plataforma Brasil.

HC - Campus Universitário
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

UNIDADE DE PESQUISA CLÍNICA
Fone (16) 3602-2632 FAX: 3602-2952

ANEXO 4

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação dos fatores de risco cardio-metabólicos na Forma Não-Clássica da Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da 21 hidroxilase

Pesquisador: ARIANE DELAI

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 96868718.1.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.951.304

Apresentação do Projeto:

A hiperplasia adrenal congênita (HAC) caracteriza-se por um conjunto de doenças genéticas de transmissão autossômica recessiva em que ocorre diminuição na produção de cortisol por deficiência de uma das cinco enzimas envolvidas na sua síntese ou das proteínas correguladoras dessas enzimas, StAR e P450 óxido redutase. Devido à redução do cortisol circulante, ocorre perda do feedback negativo deste hormônio sobre o eixo

hipotálamo-hipófise-adrenal, o que resulta em estímulo para secreção de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), exercendo efeito trófico sobre o córtex da adrenal e culminando na hiperplasia da glândula (1, 2). A HAC por deficiência de 21-hidroxilase (HAC 21OH) é responsável por 90-95% dos casos de HAC (2, 3). Essa enzima participa da síntese do cortisol, aldosterona e no processo de esteroidogênese da glândula adrenal. Na diminuição ou ausência de sua

atividade, as conversões de progesterona (P) e de 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) para desoxicorticosterona e 11-desoxicortisol, respectivamente, são alteradas deixando de sintetizar a aldosterona e o cortisol eficientemente. Em consequência à falta do cortisol e do feedback negativo, os altos níveis de ACTH levam ao acúmulo dos compostos que antecedem o bloqueio enzimático deficiente: a P na via dos mineralocorticoides e a 17-OHP na via dos glicocorticoides. Em resposta ao acúmulo destes compostos, há um desvio da síntese para o sentido de uma secreção de andrógenos: a dehidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona (4-A), a qual é

| | | |
|---------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO | | |
| Bairro: MONTE ALEGRE | CEP: 14.048-900 | |
| UF: SP | Município: RIBEIRAO PRETO | |
| Telefone: (16)3602-2228 | Fax: (16)3633-1144 | E-mail: cep@hcrp.usp.br |



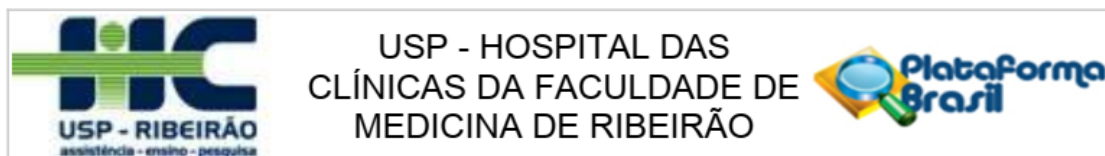
USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO



Continuação do Parecer: 2.951.304

convertida em testosterona nos tecidos periféricos. A incidência global da HAC varia de 1 em cada 16.000 nascidos vivos para as formas clássicas da doença e até 1/1.000 na forma não clássica da doença, inclusive na população brasileira (3, 5, 6), tornando-se assim a principal doença da adrenal na infância. Embora a deficiência de 21OH se apresente clinicamente como um espectro de atividade enzimática, convencionou-se agrupar clinicamente os pacientes em dois grandes grupos: a forma clássica, com hiperandrogenismo desde a gestação e a forma não clássica (5), com hiperandrogenismo manifestando-se geralmente na infância ou no início da adolescência. A forma clássica de HAC pode ser do tipo virilizante simples (VS) ou perdedora de sal (PS), sendo estes dois tipos distinguidos pela capacidade de sintetizar ou não quantidade suficiente da aldosterona (6, 7). É importante destacar que as formas clássicas e não clássicas da HAC 21OH não representam diferentes doenças, mas sim um contínuo espectro na gravidade da deficiência de 21OH. Setenta e cinco por cento dos casos de forma clássica apresentam a forma perdedora de sal, que além da hiperprodução androgênica, apresentam também deficiência mais grave na produção de aldosterona levando à desidratação com hiponatremia e hipercalemia nos primeiros 15 - 30 dias de vida, e se não tratada pode levar ao choque e óbito (7, 8). A forma não clássica é mais frequente e caracteriza-se por não apresentar virilização pré-natal. Os sintomas de hiperandrogenismo iniciam-se em épocas variáveis: na infância com a manifestação principal de pubarca precoce e na adolescência e idade adulta com hirsutismo, irregularidade menstrual, acne e infertilidade (9); portanto, o quadro clínico na mulher adulta é muito semelhante ao encontrado na síndrome dos ovários policísticos. O hiperandrogenismo em meninas também tem repercussões psicossociais, por ocasionar a adoção de comportamentos, atividades e ocupações mais tipicamente associados ao sexo masculino, embora essas pacientes em sua maioria ainda possuam identidade de gênero feminina (10). A anormalidade bioquímica mais característica da HAC 21OH é a presença de níveis elevados de 17-OHP, o principal substrato da enzima 21-hidroxilase. Na forma clássica, os níveis basais de 17-OHP encontram-se aumentados, aproximadamente 100 vezes em relação aos valores normais, em geral estão acima de 5000 ng/dl (ou 50 ng/ml) (11, 12). Na forma não clássica, porém, os valores basais de 17-OHP podem não ser suficientemente elevados para definir o diagnóstico de HAC 21OH, que poderá ser estabelecido através da realização do teste de estímulo com ACTH sintético [1-24], o qual consiste na dosagem dos níveis de 17 OHP, nos tempos 0 (basal) e 60 minutos após a administração endovenosa de 0,25 mg de ACTH sintético (13, 14). O critério diagnóstico

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 2.951.304

utilizado é a 17-OHP pós-estímulo com ACTH > 2000ng/dl (ou > 20 ng/ml).

Valores entre 1000 e 2000 ng/dl (ou 10-20 ng/ml) exigem estudo molecular para auxiliar no diagnóstico e na indicação de tratamento do indivíduo (15, 16). O tratamento da HAC 21OH consiste na administração de glicocorticoide da forma mais fisiológica

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar os fatores de risco cardio-metabólicos na forma não clássica de HAC 21OH.

Objetivo Secundário:

- Avaliar os fatores de risco cardio-metabólicos na forma não clássica da HAC 21OH;

Avaliar a correlação fenótipo-genótipo na forma não clássica da HAC 21OH; -Avaliar a correlação fenótipogenótipo com as complicações, desfechos clínicos e fatores de risco-cardiometabólicos da forma não clássica da HAC 21OH.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Considera-se que a pesquisa apresenta risco mínimo, pois não será realizada nenhuma intervenção ou modificação intencional nas variáveis fisiológicas, psicológicas ou sociais dos participantes do estudo.

Benefícios: Os participantes receberão acompanhamento médico de suas condições de saúde, podendo esclarecer dúvidas sobre sua evolução

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de mestrado. Em relação ao parecer anterior os pesquisadores responderam aos questionamentos levantados com adequação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

Aprovar o projeto

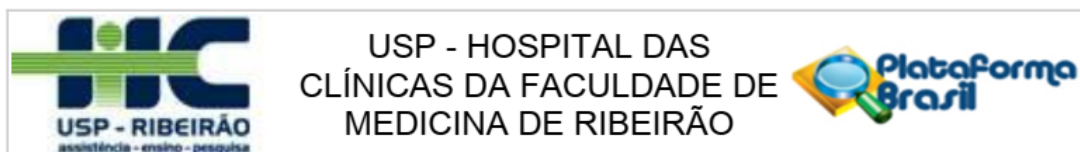
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa Versão_01_10_18, assim como os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido versão 01/10/18 e os Termos de Assentimento Versão 01/10/18, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 2.951.304

Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|--------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1111681.pdf | 01/10/2018 12:46:52 | | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | outubroTCLE_Responsaveis_Control_01_10_18.doc | 01/10/2018 12:44:20 | ARIANE DELAI | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | outubroTCLE_Responsaveis_Condicao_clinica_01_10_18.doc | 01/10/2018 12:44:07 | ARIANE DELAI | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | outubroTCLE_Adulto_Grupo_Control_01_10_18.doc | 01/10/2018 12:43:41 | ARIANE DELAI | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | outubroTCLE_Adulto_Condicao_Clinica_01_10_18.doc | 01/10/2018 12:42:33 | ARIANE DELAI | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | outubroTALE_Assentimento_Control_01_10_18.doc | 01/10/2018 12:42:03 | ARIANE DELAI | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | outubroTALE_Assentimento_Condicao_Clinica_01_10_18.doc | 01/10/2018 12:40:41 | ARIANE DELAI | Aceito |
| Outros | outubroCartaz.pptx | 01/10/2018 12:39:38 | ARIANE DELAI | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | outubroProjeto_Detalhado_01_10_18.doc | 01/10/2018 12:38:19 | ARIANE DELAI | Aceito |
| Outros | outubroCarta_ao_CEP_01_10_18.doc | 01/10/2018 12:37:49 | ARIANE DELAI | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_Responsaveis_Control_16_09_18.doc | 16/09/2018 13:03:23 | ARIANE DELAI | Aceito |
| TCLE / Termos de | TCLE_Responsaveis_Condicao_clinica | 16/09/2018 | ARIANE DELAI | Aceito |

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

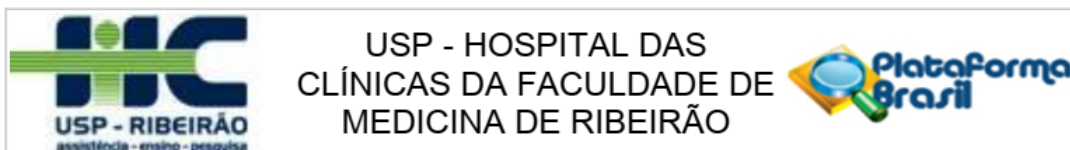
UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

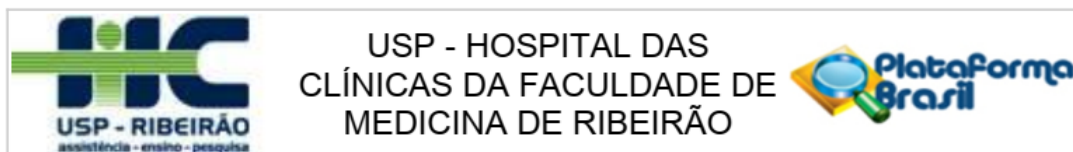
E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 2.951.304

| | | | | |
|---|---|---------------------|--------------|--------|
| Assentimento / Justificativa de Ausência | _16_09_18.doc | 13:03:17 | ARIANE DELAI | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_Adulto_Grupo_Controlado_16_09_18.doc | 16/09/2018 13:02:13 | ARIANE DELAI | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_Adulto_Condicao_Clinica_16_09_18.doc | 16/09/2018 13:02:06 | ARIANE DELAI | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TALE_Assentimento_Controlado_16_09_18.doc | 16/09/2018 13:01:57 | ARIANE DELAI | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TALE_Assentimento_Condicao_Clinica_16_09_18.doc | 16/09/2018 13:01:50 | ARIANE DELAI | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_Detalhado_16_09_18.doc | 16/09/2018 13:01:23 | ARIANE DELAI | Aceito |
| Outros | Carta_ao_CEP_16_09_18.doc | 16/09/2018 13:01:08 | ARIANE DELAI | Aceito |
| Outros | Carta_ao_CEP_120918.docx | 12/09/2018 13:17:24 | ARIANE DELAI | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | NovaVersao_Brochura_Pesquisador_120918.doc | 12/09/2018 13:16:47 | ARIANE DELAI | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | NovaVersao_TCLE_120918.doc | 12/09/2018 13:16:11 | ARIANE DELAI | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Brochura_Pesquisador_Atualizado.doc | 12/09/2018 08:55:33 | ARIANE DELAI | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_Modificado.doc | 12/09/2018 08:50:19 | ARIANE DELAI | Aceito |
| Outros | Autorizacao_prontuario.pdf | 06/06/2018 19:46:56 | ARIANE DELAI | Aceito |
| Outros | Orcamento_exames_aprovado.pdf | 06/06/2018 19:45:19 | ARIANE DELAI | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Declaracao_instituicao.pdf | 06/06/2018 19:43:04 | ARIANE DELAI | Aceito |

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO

Continuação do Parecer: 2.951.304

| | | | | |
|----------------|--------------------|------------------------|--------------|--------|
| Folha de Rosto | Folha_de_rosto.pdf | 06/06/2018 19:40:38 | ARIANE DELAI | Aceito |
|----------------|--------------------|------------------------|--------------|--------|

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 09 de Outubro de 2018

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador(a))

ANEXO 5
Aceite de publicação de artigo oriundo da tese

Hyperinsulinemic-euglycaemic clamp strengthens the insulin resistance in nonclassical congenital adrenal hyperplasia

Ariane Delai¹, Patricia M Gomes¹, Maria Cristina Foss-Freitas^{1,*}, Jorge Elias Jr², Sonir R Antonini³, Margaret Castro¹, Ayrton C Moreira¹ & Livia M Mermejo¹

Departments of ¹Internal Medicine, ²Medical Imaging, Hematology and Oncology, and ³Pediatrics - Ribeirao Preto Medical School- University of Sao Paulo, 14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil

*Current address: Division of Metabolism, Endocrinology & Diabetes and Caswell Diabetes Institute, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA

ORCID numbers:

0000-0002-1275-7014 (Ariane Delai)

0000-0001-8532-0991 (Patricia M Gomes)

0000-0002-1350-1125 (Maria C Foss-Freitas)

0000-0002-1158-1045 (Jorge Elias Jr)

0000-0003-4778-8803 (Sonir R Antonini)

0000-0003-4932-4623 (Margaret de Castro)

0000-0002-8096-6803 (Ayrton C Moreira)

0000-0001-6744-9441 (Livia M Mermejo)

Corresponding author and reprint requests should be addressed to:

Livia Mermejo

Department of Internal Medicine, Ribeirao Preto Medical School – University of Sao Paulo, Brazil, 14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil.

Email: lmermejo@hcrp.usp.br

Phone: +55 16 36022940

Financial Support: This work was supported by Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) grant 2018/10789-4 and by FAEPA grant 1083/2018.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

Data Availability: Data generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on request.

Accepted Manuscript

Abstract:

Objective: Insulin sensitivity evaluation by hyperinsulinemic-euglycaemic clamp in non-classical congenital adrenal hyperplasia (NC-CAH) due to 21-hydroxylase deficiency.

Design and Setting: Cross-sectional study at University Hospital outpatient clinics.

Patients and Methods: NC-CAH patients (25F/5M; 24 ± 10 years) subdivided into C/NC (compound heterozygous for one classical and one non-classical allele) and NC/NC (two non-classical alleles) genotypes were compared to controls.

Results: At diagnosis, C/NC patients presented higher basal and ACTH-stimulated 17OHP and androstenedione levels than NC/NC genotype. Patients and controls presented similar weight, BMI, abdominal circumference, and total fat body mass. NC-CAH patients showed higher waist-to-hip ratio, lower adiponectin and HDL cholesterol levels with no changes in fasting plasma glucose, HbA1c, HOMA-IR, adiponectin, leptin, IL-6, TNF- α , CRP, and carotid-IMT. All patients had used glucocorticoid (mean time of 73 months). Among the twenty-two patients with successful clamp, thirteen were still receiving glucocorticoid - three patients using cortisone acetate, nine dexamethasone, and one prednisone (hydrocortisone equivalent dose of 5.5 mg/m²/day), while nine patients were off glucocorticoid but had previously used (hydrocortisone equivalent dose of 5.9 mg/m²/day). The NC-CAH patients presented lower M_{fem} than controls (31 ± 20 vs 55 ± 23 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, $p=0.002$). The M_{fem} values were inversely correlated with the duration of glucocorticoid treatment ($r=-0.44$, $p=0.04$). There was association of insulin resistance and glucocorticoid type but not with androgen levels.

Conclusion: Using the gold standard method, the hyperinsulinemic-euglycemic clamp, insulin resistance was present in NC-CAH patients and related to prolonged use and long-acting glucocorticoid treatment. Glucocorticoid replacement and cardiometabolic risks should be monitored regularly in NC-CAH.

Keywords: insulin resistance, nonclassical congenital adrenal hyperplasia, hyperinsulinemic-euglycaemic clamp, genotype.

Accepted Manuscript

Introduction

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency (21-OHD) is an autosomal-recessive disease characterized by impaired biosynthesis of cortisol, affecting 1/10,000 – 1/15,000 live births ¹. The prevalence of the nonclassical form (NC-CAH) is estimated at 0.1% of the general population or even higher depending on ethnicity and race ²⁻⁴. While the classical forms of CAH are usually diagnosed at birth, the NC-CAH is usually detected in later childhood, adolescence, or adult life ⁵. Patients with NC-CAH form present with relatively mild enzyme impairment and usually do not require lifelong glucocorticoid treatment. However, in clinical practice, many of these patients are prescribed glucocorticoid for long periods to control androgen excess. The overload of glucocorticoid replacement increases cardiovascular risk factors ⁶. On the other hand, insufficient glucocorticoid therapy can lead to androgen excess and infertility ^{7,8}. Thus, the challenge in the NC-CAH treatment is to balance the ideal dose of glucocorticoid to prevent supraphysiological amounts of glucocorticoid and avoid androgen excess.

An increased overall risk for cardiovascular disease and insulin resistance has been reported in large cohorts of CAH patients, but most studies focused on classical form of CAH ^{6,9-11}. Obesity and altered body composition are also risk factors for insulin resistance; however, unfavorable glucose metabolism changes have also been detected even in non-obese CAH subjects ^{9,12}. In addition, gestational diabetes, a prediabetes condition, occurs due to insulin resistance and its frequency has been increased in NC-CAH ¹³. Our group previously showed a higher ratio of insulin response to the increment of forearm glucose uptake during a glucose stimulus in patients with classic CAH, suggesting decreased insulin sensitivity ¹⁴.

Both glucocorticoid excess and hyperandrogenism may be involved in the development of insulin resistance in healthy subjects and in CAH patients ^{15,16}, as recently demonstrated by a systematic review ⁶. In most of these studies, insulin resistance was

evaluated by indirect methods for estimating insulin sensitivity. In addition, most of them were performed in patients presenting with classical forms of CAH¹⁷⁻²¹. The hyperinsulinemic-euglycaemic clamp technique has been considered the gold-standard method to evaluate insulin sensitivity²². Recently, de Oliveira *et al* performed the hyperglycemic clamp in patients with the classical forms of CAH and reported reduced beta-cell response, which was unable to compensate the insulin resistance²³.

Few data are available on insulin resistance on patients with NC-CAH. Most of the data are obtained from small cohorts of patients with NC-CAH. Thus, we performed the hyperinsulinemic-euglycaemic clamp technique to test the hypothesis that decreased insulin sensitivity may also be observed in patients with NC-CAH form. In addition to this issue, we also evaluated clinical, anthropometrical, and biochemical parameters in NC-CAH patients presenting molecular genotype either harboring a compound heterozygous mutation, being one *CYP21A2* mutation related to CAH classical and one to non-classical form (C/NC) or patients harboring two *CYP21A2* mutations related to non-classical CAH form (NC/NC). Moreover, we evaluated the role of glucocorticoid treatment influencing these parameters since long term glucocorticoid replacement is associated to significant metabolic adverse effects, including insulin resistance and glucose intolerance. Our results showing increased metabolic risks in NC-CAH patients are important to increase the awareness of these risks and to prevent unfavorable outcome in these patients.

Patients and methods

A total of 70 NC-CAH patients followed at the Division of Endocrinology, University Hospital at Ribeirao Preto Medical School - University of Sao Paulo, a tertiary center for adrenal diseases in Brazil, were contacted by mail and by phone (Figure 1). Among contacted patients, 30 agreed to participate. The 40 other patients either had lost to follow-up (n=18), or refused to participate (n=15), or presented exclusion criteria such as type 2 diabetes (n=4), hepatic disease (n=2), or cognitive dysfunction (n=1). Twenty-five healthy

subjects (22F/3M) matched for sex and BMI were enrolled as controls. Patients had stable body weight over the last three months before enrollment in the study and were not taking medications known to affect glucose metabolism besides glucocorticoids and estrogens. Among 25 NC CAH female patients, nine used oral contraceptive pills, two progestin-only pills and one vaginal ring. Among 22 female controls, four used oral contraceptive pills, two progestin-only pills, two intrauterine devices, one levonorgestrel-releasing intrauterine device, and one contraceptive implant.

The diagnosis of NC-CAH due to 21-OHD was confirmed by serum basal 17-hydroxyprogesterone and after ACTH (Cosyntropin ACTH 1–24, Synacthen®, Novartis, Australia) and treatment of these patients were performed based on the Endocrine Society consensus for CAH ²⁴. Genotype was obtained by molecular analysis of the *CYP21* gene in all patients, except two, as previously described ²⁵. NC-CAH patients were subdivided into two subgroups according to genotype: patients harboring a compound heterozygous mutation being one *CYP21* mutation related to classical CAH and one to non-classical (C/NC) forms or patients harboring two *CYP21* mutations related to non-classical CAH forms (NC/NC).

The Ethical Committee of the Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo (protocol number 2.951.304) approved the study and the participants gave written informed consent.

Study design

Anthropometry and body composition

Height was measured using a stadiometer and weight a digital scale to calculate BMI. Whole-body fat was measured by bioelectrical impedance (Biodynamics BIA310®, Seattle, WA, USA). Fat mass and fat free mass were calculated from the percent body fat and body weight. All these parameters were evaluated by the authors at the time of this study.

Blood analysis

Blood lipids (triglycerides [TGs], total cholesterol [TC], and high-density lipoprotein [HDL]) concentrations were measured by enzymatic colorimetric method (Atellica ©CH, Siemens Heathineers, Erlangen, Germany). Low-density lipoprotein (LDL) was calculated by the Friedewald formula [LDL = TC - (TGs/5 + HDL)]. Plasma glucose was analyzed by an enzymatic method (Atellica ©CH Analyzer Glucose Hexokinase_3, Siemens Heathineers, Erlangen, Germany). Basal insulin was measured by radioimmunoassay (IMMULITE© 2000, Siemens Healthcare Diagnostics, Los Angeles, CA, USA). Glycated hemoglobin (HbA1c) levels were determined using high-performance liquid chromatography (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA). C-reactive protein highly sensitive (CRPhs) was measured by immunoturbidimetric assay (Linea Turbitest AA, Wiener lab, Argentina). Serum cytokines (IL-6, TNF- α) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using Multiplex kit (Merck Millipore, Texas, USA). The adiponectin levels were determined by ELISA technique (Merck Millipore, Houston, TX, USA).

Carotid intima-media thickness (Carotid-IMT)

Carotid-IMT was evaluated by ultrasound system (EPIQ 7, Philips Healthcare, Cambridge, MA, USA). For each participant, two carotid-IMT measures were performed bilaterally at the far wall of distal common carotid (1.0 cm below the carotid bifurcation), in the true longitudinal plane, using a Philips proprietary quantitative software application with automatic segmentation of media-intima thickness. Measurements were obtained for at least 1-cm length and expressed in millimeters as means \pm standard deviation (SD)²⁶. Ultrasound examinations were performed by a skilled examiner who was unaware of clinical and laboratory findings of participants. As an index of vascular atherosclerosis, the value of IMT > 0.9 mm was used²⁷.

Insulin sensitivity

To evaluate tissue sensitivity to insulin, the hyperinsulinemic-euglycaemic clamp was performed^{22,28}. Briefly, it consisted of the following procedure: two venous accesses were obtained using 20-gauge catheters; the first was placed retrograde in a right-hand vein to obtain blood samples. The hand was wrapped with a thermal pillow until it reaches the temperature $>40^{\circ}\text{C}$ to arterialize the blood. The second venous access was taken in the contralateral arm for continuous insulin infusion (Humulin R, Eli Lilly Co, Brazil) targeted to achieve plasma insulin levels of ~ 600 pmol/L. Thereafter, the insulin infusion rate was fixed at 120 mU/m².min. This insulin dose was considered high enough to completely suppress hepatic glucose production. The blood glucose levels were maintained at the normal fasting levels (coefficient of variation of 5%–10%), throughout the study (120 min), by infusing 10% glucose at various rates according to blood glucose measurements performed at 5-min intervals. At the end of the clamp, glucose infusion was maintained for an additional 30 min as a precautionary measure to avoid hypoglycemia.

Glucose metabolized (M) was calculated using a specific computer program based on original formulas^{22,29} to evaluate insulin sensitivity, which was calculated considering glucose infusion rate (GIR) corrected by the glucose distribution space over the last 40 min (steady state). The M was corrected for fat free mass (M_{ffm}) and expressed as $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ ²⁹. The M_{ffm} was obtained during 80- to 120-minutes period of the clamp and was obtained for the NC-CAH and control groups.

Insulin resistance was also evaluated by calculating HOMA-IR (homeostasis model assessment-insulin resistance). The HOMA-IR index was calculated by the formula: [fasting glucose (mmol/L) \times basal insulin ($\mu\text{U}/\text{mL}$)]/[22.5], with normal values <2.71 ³⁰.

Statistical analyses

Variables with a normal distribution were expressed as the mean \pm SD, and variables with a nonnormal distribution were expressed as the median and interquartile range. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test for multiple continuous variables (post-test of Dunn's), when appropriate. Categorical variables were compared using Fisher's exact test. Spearman's correlation analyses were used to explore relationships. Data analyses were carried out with the statistical package GraphPad PRISM 8 (GraphPad Software, Inc., 2020, La Jolla, CA, USA). Significance was assumed when $P \leq 0.05$.

Results

Thirty patients with NC-CAH (25F/5M) and 25 healthy participants (22F/3M) were enrolled in the study. Nineteen out of 30 NC-CAH patients were diagnosed during childhood at the mean age of 7.5 ± 2.4 years, presenting premature pubarche (87%), clitoromegaly (10%), hirsutism (5%), and/or rapidly progressive puberty (5%). Eleven out of 30 NC-CAH were adolescent or adult women diagnosed at the mean age of 25.2 ± 10.6 years with menstrual abnormalities (70%), hirsutism (63%) and/or clitoromegaly (18%). Of note, one adult patient presented primary amenorrhea as the unique symptom.

The basal and ACTH-stimulated 17OHP mean levels were 1741 ± 2171 ng/dL (range 223 - 9905) and 5307 ± 4206 ng/dL (range 1115 - 19884), respectively. The most frequent mutation was the p.V281L (65% of the alleles) being 40% in homozygosis (NC/NC) and 14% were compound heterozygous for p.V281L and p.L446P, or p.A265V, or p.453S. Forty-six percent of the patients were compound heterozygous for one classic and one non-classical

allele (C/NC). Allelic variants associated with classical CAH form were p.I172N, IVS2-13A/C>G, Δ8, CL6, p.Q318X, and p.R356W.

All thirty patients had used glucocorticoid (mean time of 73, 5-318 months). At the diagnosis, children were treated with cortisone acetate and adults with dexamethasone. During the follow-up, 35% of the adult patients had discontinued glucocorticoid treatment as they were asymptomatic.

At diagnosis, patients carrying the C/NC genotype presented higher 17OHP basal (2490 ± 2700 vs. 1045 ± 1272 ng/dL; $p=0.02$) and ACTH-stimulated 17OHP values (7152 ± 4715 vs. 2769 ± 1011 ng/dl; $p=0.002$) as well as higher basal androstenedione levels (387 ± 517 ng/dL vs. 190 ± 239 ; $p=0.03$) compared to NC/NC genotype.

At the time of the present study, the mean age of NC-CAH patients and controls were 24 ± 10 and 34 ± 11 years ($p=0.007$), respectively. Patients and controls presented similar body weight (70 ± 20 vs. 70 ± 14.8 kg), BMI (27 ± 7 vs. 26 ± 5 kg/m²), and abdominal circumference (93 ± 16 vs. 91 ± 13 cm), but NC-CAH patients showed higher waist-to-hip ratio (0.93 ± 0.09 vs. 0.86 ± 0.09 cm, $p=0.004$) than controls. Based on World Health Organization criteria ³¹, NC-CAH patients showed overweight (24%), obesity (31%), and altered lipids (17%), with similar findings observed in the control group. No difference was observed in blood pressure between the NC-CAH patients and controls. Comparisons between the groups are shown in Table 1.

Fasting plasma glucose (mmol/L) was normal in the NC-CAH patients (4.4 ± 0.3) and controls (4.6 ± 0.4). The same was observed regarding HbA1c (%) levels (4.9 ± 0.3 and 5.2 ± 0.4) (Table 2). NC-CAH patients and controls presented similar fasting insulin (9.0 ± 8.0 vs. 6.8 ± 3.5 uIU/ml) and HOMA-IR (1.7 ± 1.7 vs. 1.3 ± 0.7). Adiponectin and HDL cholesterol levels were lower in NC-CAH group compared to controls (236 ± 295 vs. 561 ± 527 μg/dL, $p=0.03$ and 53 ± 13 vs. 61 ± 14 mg/dL, $p=0.04$, respectively). There were no significant changes in other serum lipids, leptin, IL-6, TNF-alfa, and CRP concentrations in both groups.

Regarding carotid-IMT, the values were similar between groups (left carotid-IMT 0.58 ± 0.22 vs 0.51 ± 0.11 mm, $p=0.68$; and right carotid-IMT 0.59 ± 0.22 vs 0.46 ± 0.06 mm, $p=0.13$). The metabolic parameters and carotid-IMT were similar between both genotype groups independently of the glucocorticoid treatment.

The values (median, 5th, and 95th percentiles) of corrected M for the free fat mass (M_{fpm} , $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) obtained by the hyperinsulinemic-euglycaemic clamp in our control group were 51, 18.8 and 97.8, respectively, considering the 80- to 120- minutes period of the clamp. Steady-state was obtained with a serum glucose level of 80 mg/dL on average. The NC-CAH patients as a group presented lower M_{fpm} (median 24, ranging from 11 and 85 and mean \pm SD of 31 ± 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) compared to controls (55 ± 23 , $p=0.002$, Figure 2A). There was no difference in M_{fpm} between C/NC (28 ± 18) and NC/NC (32 ± 23) genotypes, and both had lower M_{fpm} compared to controls ($p=0.01$ and 0.02 , respectively). The NC/NC and C/NC groups were also taking similar glucocorticoid equivalent hydrocortisone doses (5.8 ± 2.1 and 4.4 ± 3.3 mg/m²/day, $p=0.8$).

Among the twenty-two patients with successful clamp, thirteen were still receiving glucocorticoid treatment (three patients using cortisone acetate, nine dexamethasone, and one prednisone) in a hydrocortisone equivalent dose of 5.5 mg/m²/day, while nine patients were off glucocorticoid but had previously used glucocorticoid in a mean dose of 5.9 mg/m²/day of hydrocortisone equivalent dose. To answer the question if NC-CAH patients using or not glucocorticoid presented different M_{fpm} compared to controls, the Kruskal Wallis followed by Dunn's multiple comparisons test showed that only NC-CAH patients on glucocorticoid treatment at the time of the clamp study presented lower M_{fpm} than controls (26 ± 22 vs 55 ± 23 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$; $p=0.0009$). Comparing NC-CAH patients with and without glucocorticoid treatment at the time of the clamp study, the NC-CAH with glucocorticoid presented lower M_{fpm} than patients without glucocorticoid (26 ± 22 vs. 36 ± 17 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$; $p=0.01$).

Among patients on glucocorticoid, the three patients using cortisone acetate presented higher M_{ffm} than the nine patients using dexamethasone (55.5 ± 31 vs 16.7 ± 4.7 , $p=0.02$). However, patients on cortisone acetate were younger (aging from 10 to 15 years old) than patients on dexamethasone (aging from 15 to 48 years old). Of note, one patient was excluded for the analysis due to an irregular follow-up, with unavailable data on the dose and the duration of glucocorticoid treatment. There was no association between the time without glucocorticoid and insulin resistance ($r=0.1$, $p=0.7$). Furthermore, there was no association between insulin resistance and the androgen levels evaluated by the mean levels of androstenedione obtained by two measurements performed in the last two years before the evaluation of insulin sensitivity ($r= -0.2$; $p=0.4$).

As all NC-CAH patients either had used or were using glucocorticoid, the M_{ffm} values of these patients were inversely correlated with the duration of glucocorticoid treatment ($r=-0.44$, $p=0.04$; Figure 2B). Indeed, after 60 months of treatment, 62% (13/21) of NC-CAH patients had M_{ffm} values below the 25th percentile observed in the control group, suggesting insulin resistance in the majority of treated NC-CAH patients. During the study, we diagnosed a 47-year-old woman with NC-CAH who presented menstrual abnormalities and hirsutism since puberty and has never been treated with glucocorticoid. This patient showed the highest M_{ffm} ($105 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) among NC-CAH patients, but she was not included in the analysis (Figure 2B).

Discussion

In the present study, using hyperinsulinemic-euglycaemic clamp technique, we originally confirmed that NC-CAH patients, independently of the C/NC and NC/NC genotypes, presented insulin resistance that was associated with long-term glucocorticoid use. In addition, insulin resistance was also associated with long-action glucocorticoid such as dexamethasone. Our data add new knowledge to this area since the majority of previous studies have focused on classical form of CAH^{6,23,32}. Thus, the finding of insulin resistance in

addition to other evident metabolic risk components such as higher waist-to-hip ratio, low adiponectin and HDL cholesterol levels clearly demonstrate the need for a close patient follow up to avoid the increased cardiometabolic risks presented in this disease.

NC-CAH patients of our series showed typical clinical presentation at infancy as premature pubarche, clitoromegaly, hirsutism, and/or rapidly progressive puberty or at young adult life as menstrual abnormalities, including primary amenorrhea, hirsutism, and clitoromegaly, compatible with previous studies²⁴, with no phenotype difference observed between C/NC and NC/NC genotypes. The most frequent *CYP21A2* variant associated with NC-CAH was the p.V281L, observed in 65% of the alleles, while p.I172N, IVS2-13A/C>G, Δ 8, CL6, p.Q318X, and p.R356W were the alleles associated with classical CAH form. These are the most common *CYP21A2* mutations associated with 21OHD worldwide and in the Brazilian population^{24,25}.

On the other hand, basal and ACTH-stimulated 17OHP and basal androstenedione levels were higher in patients with the C/NC genotype compared to those with the NC/NC genotype, reflecting the degree enzyme impairment caused by severity of the *CYP21A2* variants. Our findings are in accordance with previous report describing higher 17OHP in C/NC than in NC/NC genotypes in 280 individuals with NC-CAH³³. Indeed, in the early of 1990s, our group evidenced normal basal cortisol levels, but with subnormal cortisol response to ACTH as well as higher plasma ACTH response to oCRH in NC-CAH patients compared to controls and heterozygotes, confirming graded severities of adrenal biosynthetic defect in this disease^{34,35}.

The majority of NC-CAH patients evaluated in this study presented overweight or obesity. Obesity has been reported in NC-CAH patients varying from 12 to 41%^{11,36}, similarly to our findings (31%). A recent Korean study showed that overweight and obesity were common (56%) in children and young adults with CAH. These authors also found impaired fasting glucose more prevalent in those patients on higher glucocorticoid doses³⁷.

On the other hand, a recent retrospective study evaluating NC-CAH patients diagnosed in childhood/adolescence showed no increased risk of overweight and obesity in early adulthood ²¹. Although in our series, the weight, body fat mass index, and abdominal circumference were similar between NC-CAH patients and controls, the waist-to-hip ratio was higher in NC-CAH, suggesting increased abdominal adiposity.

Increased incidence of cardiovascular and metabolic risk among Swedish adults with classic CAH form ⁹ have been demonstrated. Other studies showed higher carotid intima-media thickness, a surrogate marker of atherosclerosis, only in patients with the classical CAH form ^{38,39}. Our data showed that NC-CAH patients had no altered blood pressure and no difference in carotid-IMT compared to controls. Increased carotid-IMT in children and adolescents with classical and nonclassical CAH forms has been reported ²⁰, however our data does not confirm this finding.

In our study, fasting plasma glucose and HbA1c, fasting insulin, and HOMA-IR were normal in both the NC-CAH and control groups. A meta-analysis and a systematic review performed by Tamhane *et al*, showed that CAH patients had increased blood pressure, insulin resistance, and carotid-IMT with no difference in fasting glucose or lipids ⁶. Our results in NC-CAH are in agreement with this meta-analysis regarding insulin resistance and fasting glucose, but not with blood pressure and carotid-IMT findings. It is important to mention that in that meta-analysis, among 437 patients evaluated in 14 studies, only 29 patients had the nonclassical form of the CAH ⁶. Recently, Falhammar *et al* also evaluated 407 classical and 75 nonclassical CAH patients and demonstrated increased cardiovascular and metabolic morbidities in these patients ⁹. There are contradictory results in the literature on endothelial dysfunction, considered an early marker of atherosclerosis. In many studies, carotid-IMT was found to be altered but there are many interfering factors such as heterogeneous population, inflammatory markers, and insulin resistance^{6,39}. The impossibility to control all these factors might contribute for the controversial data. In addition, in our study, the NC-CAH patients are young adults; so, it is possible that long term

surveillance might confirm the increased cardiovascular risks. Of note, in the present study, adiponectin and HDL cholesterol levels were lower in NC-CAH patients in accordance with a previous report that studied adult patients with classical CAH form¹². Hypoadiponectinemia has been observed in several metabolic disorders, in obesity, type 2 diabetes⁴⁰, and during the administration of glucocorticoids⁴¹. Of interest, in our study, the metabolic parameters were similar between both genotype groups and between patients on glucocorticoid treatment or who had been treated with glucocorticoid.

We used the hyperinsulinemic-euglycaemic clamp to evaluate tissue sensitivity to insulin. This method is considered the gold standard and has better reproducibility than others^{22,29}. We demonstrated lower tissue sensitivity to insulin (M_{fif}) during the clamp compared to controls. Our values of M_{fif} in control group were similar to those previously described in white non-diabetic, normotensive patients with BMI >25 kg/m², with median of 53 ranging from 19 to 87 for women and 53 ranging from 20 to 84 for men²⁹. Since previous studies using clamp were performed mainly in patients with classical form of CAH⁴²⁻³², our data on NC-CAH patients are original. Very recently, de Oliveira *et al* studied, using hyperglycemic clamp, CAH patients presenting the classical form of the disease and found significant insulin resistance with compensatory hyperinsulinemia among euglycemic patients²³.

Similar to data found in classical CAH form, our data using hyperinsulinemic-euglycaemic clamp in NC-CAH found significant insulin resistance among obese and nonobese NC-CAH 21-OHD patients, independently of their genotypes. Differently from our study, most studies evaluating insulin resistance focused on classical form of CAH^{6,9-11} and used indirect methods for estimating insulin sensitivity. It has been well known that hyperandrogenism may be associated with insulin resistance in healthy subjects and in CAH patients^{6,14,15,16}. Recently, Debono *et al*, found a proportional increase in classic and backdoor androgen pathway metabolites in treated adults as CAH control deteriorates⁴³. Therefore, in NC-CAH patients, even the mild hyperandrogenism might contribute to the

insulin resistance observed in our patients. In addition, Stepto *et al* reported the high prevalence of insulin resistance on clamp studies in women with polycystic ovarian syndrome (PCOS)⁴⁴. Indeed, women with NC-CAH usually present with polycystic ovarian morphology⁴⁵. Therefore, we could not totally exclude that insulin resistance observed in our young women patients with NC-CAH may be partially dependent of the association of hyperandrogenism observed either in the disease *per se* or in PCOS associated with CAH⁴⁶.

We also demonstrated that insulin resistance was inversely correlated with the duration of glucocorticoid treatment, even in patients on low doses of glucocorticoid. Indeed, the insulin sensitivity decreased after 60 months of glucocorticoid use either in patients on glucocorticoid treatment or in patients who had previously used glucocorticoid. We also observed an association with glucocorticoid type that patients were using and insulin resistance. Patients on cortisone acetate presented higher M_{fm} than patients using dexamethasone, suggesting more insulin resistance in these patients. However, patients on cortisone acetate were younger than those on dexamethasone; thus, they have been used glucocorticoid for shorter time. In addition, the small number of patients studied claims for further studies in other subsets of NC-CAH patients.

Debono *et al.* studied a twenty-four-hour serum sampling for ACTH, 17OHP, androstenedione as well as a panel of other androgen metabolites in sixteen patients with classical CAH on prednisone or dexamethasone treatment. They found a significant circadian rhythmicity of these hormones, most likely by an effect related to circadian regulation of the endogenous timing system by the central clock in the suprachiasmatic nucleus⁴³. The analysis of 24-h profiles for androstenedione and 17OHP indicated that patients on long-acting glucocorticoids maintain these hormonal rhythms but exhibit wide hormonal fluctuations, suggesting that androgen suppression may be transient even for long- and intermediate-acting glucocorticoids with wide inter-individual variability⁴³.

A baseline cortisol secretion is usually normal in untreated NC-CAH patients³⁵. In addition, a cortisol circadian rhythm may exist in children with CAH without treatment⁴⁷. Circulating cortisol works as a transducer of circadian signals from the suprachiasmatic nucleus pacemaker to reset peripheral tissues clock genes⁴⁸. Treatment with synthetic glucocorticoids resulted in raised levels of glucocorticoids throughout the day with loss of both ultradian and circadian oscillations^{49,50}. Therefore, glucocorticoid treatment in CAH patients leads to a disruption on endogenous cortisol circadian rhythm, resets peripheral clock genes, and contributes to the development of diseases associated with insulin resistance and metabolic syndrome^{43,49,51}. Thus, both, the hyperandrogenism and the glucocorticoid treatment exert effects on glucose metabolism, requesting constant reevaluation of the treatment of NC-CAH patients to reduce metabolic complications. For instance, as suggested by the last consensus, glucocorticoid treatment should be avoided for women presenting NC-CAH with signs of hyperandrogenism who are not planning pregnancy. In this case, oral contraceptives and/or anti-androgen therapy should be preferred²⁴.

The strength of our study stands on the use of the hyperinsulinemic-euglycaemic clamp in a series of patients with NC-CAH, since this method is the gold standard to evaluate insulin sensitivity. Another strength is the correlation of insulin resistance and the status and type of glucocorticoid treatment in NC-CAH patients that brings a clinical applicability, which is that glucocorticoid treatment should be done when strictly necessary to avoid insulin resistance. The clamp method is invasive, labor-intensive, and has potential adverse effects justifying the relatively modest number of NC-CAH patients and controls, which may result in low power for some parameters in the statistical analyses.

In summary, we report, for the first time, the presence of insulin resistance evaluated by hyperinsulinemic-euglycaemic clamp in a series of NC-CAH patients, which was related to prolonged use of glucocorticoid and long-acting glucocorticoid treatment. Besides insulin resistance, increased abdominal adiposity and low adiponectin and HDL cholesterol levels were also demonstrated in NC-CAH patients. Thus, the constant reevaluation of glucocorticoid replacement and the monitoring of cardiometabolic risk factors should be performed regularly in NC-CAH patients in an attempt to improve the clinical outcome. Long-term studies on older patients with NC-CAH are needed to better establish the real cardiovascular risk factors presented in these patients.

Accepted Manuscript

References

1. Merke DP, Auchus RJ. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to 21-Hydroxylase Deficiency. *N Engl J Med*. 09 24 2020;383(13):1248-1261. doi:10.1056/NEJMra1909786
2. New MI. Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. Nov 2006;91(11):4205-14. doi:10.1210/jc.2006-1645
3. Nordenström A, Falhammar H. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Diagnosis and management of the patient with non-classic CAH due to 21-hydroxylase deficiency. *Eur J Endocrinol*. Mar 2019;180(3):R127-R145. doi:10.1530/EJE-18-0712
4. Claahsen-van der Grinten HL, Speiser PW, Ahmed SF, et al. Congenital adrenal hyperplasia - current insights in pathophysiology, diagnostics and management. *Endocr Rev*. May 2021;doi:10.1210/edrev/bnab016
5. Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia: transition from childhood to adulthood. *J Endocrinol Invest*. Oct 2001;24(9):681-91.
6. Tamhane S, Rodriguez-Gutierrez R, Iqbal AM, et al. Cardiovascular and Metabolic Outcomes in Congenital Adrenal Hyperplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 11 2018;103(11):4097-4103. doi:10.1210/jc.2018-01862
7. Han TS, Stimson RH, Rees DA, et al. Glucocorticoid treatment regimen and health outcomes in adults with congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Feb 2013;78(2):197-203. doi:10.1111/cen.12045
8. El-Maouche D, Arlt W, Merke DP. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet*. Nov 2017;390(10108):2194-2210. doi:10.1016/S0140-6736(17)31431-9
9. Falhammar H, Frisén L, Hirschberg AL, et al. Increased Cardiovascular and Metabolic Morbidity in Patients With 21-Hydroxylase Deficiency: A Swedish Population-Based National Cohort Study. *J Clin Endocrinol Metab*. Sep 2015;100(9):3520-8. doi:10.1210/JC.2015-2093
10. Reisch N. Review of Health Problems in Adult Patients with Classic Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. Feb 2019;127(2-03):171-177. doi:10.1055/a-0820-2085
11. Arlt W, Willis DS, Wild SH, et al. Health status of adults with congenital adrenal hyperplasia: a cohort study of 203 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. Nov 2010;95(11):5110-21. doi:10.1210/jc.2010-0917
12. Zhang HJ, Yang J, Zhang MN, et al. Metabolic disorders in newly diagnosed young adult female patients with simple virilizing 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine*. Oct 2010;38(2):260-5. doi:10.1007/s12020-010-9382-9
13. Hirschberg AL, Gidlöf S, Falhammar H, et al. Reproductive and Perinatal Outcomes in Women with Congenital Adrenal Hyperplasia: A Population-based Cohort Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 01 23 2021;106(2):e957-e965. doi:10.1210/clinem/dgaa801
14. 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*. Nov 1994;26(11):552-6. doi:10.1055/s-2007-1001755
15. Paizoni L, Auer MK, Schmidt H, Hübner A, Bidlingmaier M, Reisch N. Effect of androgen excess and glucocorticoid exposure on metabolic risk profiles in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 03 2020;197:105540. doi:10.1016/j.jsbmb.2019.105540

16. van Raalte DH, Brands M, van der Zijl NJ, et al. Low-dose glucocorticoid treatment affects multiple aspects of intermediary metabolism in healthy humans: a randomised controlled trial. *Diabetologia*. Aug 2011;54(8):2103-12. doi:10.1007/s00125-011-2174-9
17. Williams RM, Deeb A, Ong KK, et al. Insulin sensitivity and body composition in children with classical and nonclassical congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Feb 2010;72(2):155-60. doi:10.1111/j.1365-2265.2009.03587.x
18. Speiser PW, Serrat J, New MI, Gertner JM. Insulin insensitivity in adrenal hyperplasia due to nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. Dec 1992;75(6):1421-4. doi:10.1210/jcem.75.6.1464643
19. Saygılı F, Oge A, Yilmaz C. Hyperinsulinemia and insulin insensitivity in women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: the relationship between serum leptin levels and chronic hyperinsulinemia. *Horm Res*. 2005;63(6):270-4. doi:10.1159/000086363
20. Wasniewska M, Balsamo A, Valenzise M, et al. Increased large artery intima media thickness in adolescents with either classical or non-classical congenital adrenal hyperplasia. *J Endocrinol Invest*. Jan 2013;36(1):12-5. doi:10.3275/8194
21. de Vries L, Lebenthal Y, Phillip M, Shalitin S, Tenenbaum A, Bello R. Obesity and Cardiometabolic Risk Factors in Children and Young Adults With Non-classical 21-Hydroxylase Deficiency. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:698. doi:10.3389/fendo.2019.00698
22. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. Sep 1979;237(3):E214-23. doi:10.1152/ajpendo.1979.237.3.E214
23. de Oliveira DM, Tura A, Vasques ACJ, et al. Insulin Resistance in Congenital Adrenal Hyperplasia is Compensated for by Reduced Insulin Clearance. *J Clin Endocrinol Metab*. Mar 2021;106(4):e1574-e1585. doi:10.1210/clinem/dgab010
24. Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, et al. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 11 2018;103(11):4043-4088. doi:10.1210/jc.2018-01865
25. Coeli-Lacchini FB, Turatti W, Elias PC, et al. A rational, non-radioactive strategy for the molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Gene*. Sep 2013;526(2):239-45. doi:10.1016/j.gene.2013.03.082
26. Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, et al. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J Am Soc Echocardiogr*. Feb 2008;21(2):93-111; quiz 189-90. doi:10.1016/j.echo.2007.11.011
27. Williams B, Mancia G, Spiering W, et al. 2018 Practice Guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension and the European Society of Cardiology: ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens*. 12 2018;36(12):2284-2309. doi:10.1097/HJH.0000000000001961
28. Gomes PM, Hollanda-Miranda WR, Beraldo RA, et al. Supplementation of α -linolenic acid improves serum adiponectin levels and insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Nutrition*. Jun 2015;31(6):853-7. doi:10.1016/j.nut.2014.12.028
29. Ferrannini E, Mari A. How to measure insulin sensitivity. *J Hypertens*. Jul 1998;16(7):895-906. doi:10.1097/00004872-199816070-00001

30. Geloneze B, Vasques AC, Stabe CF, et al. HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome: Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). *Arq Bras Endocrinol Metabol*. Mar 2009;53(2):281-7. doi:10.1590/s0004-27302009000200020
31. de Onis M, Habicht JP. Anthropometric reference data for international use: recommendations from a World Health Organization Expert Committee. *Am J Clin Nutr*. Oct 1996;64(4):650-8. doi:10.1093/ajcn/64.4.650
32. 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*. Dec 2009;161(6):887-94. doi:10.1530/EJE-09-0523
33. Livadas S, Dracopoulou M, Dastamani A, et al. The spectrum of clinical, hormonal and molecular findings in 280 individuals with nonclassical congenital adrenal hyperplasia caused by mutations of the CYP21A2 gene. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Apr 2015;82(4):543-9. doi:10.1111/cen.12543
34. Elias LL, Voltarelli JC, Moreira AC. Adrenal response to adrenocorticotropin hormone and HLA typing of subjects with different degrees of 21-hydroxylase deficiency. *Braz J Med Biol Res*. Feb 1993;26(2):177-89.
35. Moreira AC, Elias LL. Pituitary-adrenal responses to corticotropin-releasing hormone in different degrees of adrenal 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. Jan 1992;74(1):198-203. doi:10.1210/jcem.74.1.1309366
36. Carmina E, Rosato F, Janni A, Rizzo M, Longo RA. Extensive clinical experience: relative prevalence of different androgen excess disorders in 950 women referred because of clinical hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*. Jan 2006;91(1):2-6. doi:10.1210/jc.2005-1457
37. Yoon JY, Cheon CK. Genotype and clinical outcomes in children with congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Int*. Sep 2020;doi:10.1111/ped.14478
38. Sartorato P, Zulian E, Benedini S, 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*. Mar 2007;92(3):1015-8. doi:10.1210/jc.2006-1711
39. Rodrigues TM, Barra CB, Santos JL, Goulart EM, Ferreira AV, Silva IN. Cardiovascular risk factors and increased carotid intima-media thickness in young patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Arch Endocrinol Metab*. Dec 2015;59(6):541-7. doi:10.1590/2359-3997000000119
40. Bueno AC, Sun K, Martins CS, et al. A novel ADIPOQ mutation (p.M40K) impairs assembly of high-molecular-weight adiponectin and is associated with early-onset obesity and metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. Apr 2014;99(4):E683-93. doi:10.1210/jc.2013-3009
41. Böttner A, Kratzsch J, Müller G, et al. Gender differences of adiponectin levels develop during the progression of puberty and are related to serum androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab*. Aug 2004;89(8):4053-61. doi:10.1210/jc.2004-0303
42. Tam CS, Xie W, Johnson WD, Cefalu WT, Redman LM, Ravussin E. Defining insulin resistance from hyperinsulinemic-euglycemic clamps. *Diabetes Care*. Jul 2012;35(7):1605-10. doi:10.2337/dc11-2339

43. Debono M, Mallappa A, Gounden V, et al. Hormonal circadian rhythms in patients with congenital adrenal hyperplasia: identifying optimal monitoring times and novel disease biomarkers. *Eur J Endocrinol*. Dec 2015;173(6):727-37. doi:10.1530/EJE-15-0064
44. Stepto NK, Cassar S, Joham AE, et al. Women with polycystic ovary syndrome have intrinsic insulin resistance on euglycaemic-hyperinsulaemic clamp. *Hum Reprod*. Mar 2013;28(3):777-84. doi:10.1093/humrep/des463
45. Carmina E, Dewailly D, Escobar-Morreale HF, et al. Non-classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency revisited: an update with a special focus on adolescent and adult women. *Hum Reprod Update*. 09 01 2017;23(5):580-599. doi:10.1093/humupd/dmx014
46. Teede HJ, Misso ML, Deeks AA, et al. Assessment and management of polycystic ovary syndrome: summary of an evidence-based guideline. *Med J Aust*. Sep 19 2011;195(6):S65-112. doi:10.5694/mja11.10915
47. Frisch H, Parth K, Schober E, Swoboda W. Circadian patterns of plasma cortisol, 17-hydroxyprogesterone, and testosterone in congenital adrenal hyperplasia. *Arch Dis Child*. Mar 1981;56(3):208-13. doi:10.1136/adc.56.3.208
48. Moreira AC, Antonini SR, de Castro M. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: A sense of time of the glucocorticoid circadian clock: from the ontogeny to the diagnosis of Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol*. Jul 2018;179(1):R1-R18. doi:10.1530/EJE-18-0102
49. Lightman SL, Birnie MT, Conway-Campbell BL. Dynamics of ACTH and Cortisol Secretion and Implications for Disease. *Endocr Rev*. 06 01 2020;41(3)doi:10.1210/edrev/bnaa002
50. Merke DP, Mallappa A, Arlt W, et al. Modified-Release Hydrocortisone in Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 04 23 2021;106(5):e2063-e2077. doi:10.1210/clinem/dgab051
51. Antonini SR, Jorge SM, Moreira AC. The emergence of salivary cortisol circadian rhythm and its relationship to sleep activity in preterm infants. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Apr 2000;52(4):423-6.

Acknowledgments

We thank Maria Fernanda O. Tico Toste Brondi, Wendy Turatti, Renata Pugliesi and Jose Roberto da Silva for technical support.

Accepted Manuscript

Legends for Figures and Tables

Table 1: Clinical and biochemical parameters in patients with nonclassical form of congenital adrenal hyperplasia (NC-CAH) and controls.

Table 2: Metabolic characteristics in patients with nonclassical form of congenital adrenal hyperplasia (NC-CAH) and controls.

Figure 1: Flow chart of the prospective study in patients with nonclassical form of congenital adrenal hyperplasia.

Figure 2: A. Tissue sensitivity to insulin obtained during hyperinsulinemic-euglycaemic clamp expressed by M_{fem} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) in patients with nonclassical form of congenital adrenal hyperplasia (NC-CAH) and controls; B. Relationship of the M_{fem} and the duration of glucocorticoids treatment in months. The grey area represents the M_{fem} (5th – 95th percentiles) and the dotted lines represent the M_{fem} 25th and 75th percentiles of the control group. Closed and open circles represent NC-CAH patients on dexamethasone and off glucocorticoid treatment at the time of the study, respectively. Closed squares represent NC-CAH patients on cortisone acetate treatment at the time of the study. * $p= 0.002$; # represents a NC-CAH patient who has never been treated.

Table 1

| | NC-CAH | Controls | *p | NC/NC | C/NC | **p |
|---------------------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| N | 30 | 25 | | 15 | 13 | |
| Age, years | 24 ± 10 | 34 ± 11 | 0.007 | 21 ± 8 | 29 ± 11 | 0.03 |
| Female, n (%) | 25 (83%) | 21 (84%) | | 11 (73%) | 12 (92%) | |
| BMI, kg/m² | 27 ± 7 | 26 ± 5 | 0.63 | 29 ± 9 | 26 ± 5 | 0.59 |
| Waist Circunference, cm | 93 ± 16 | 91 ± 13 | 0.45 | 91 ± 14 | 94 ± 18 | 0.63 |
| WHR (waist-to-hip ratio) | 0.93 ± 0.09 | 0.86 ± 0.09 | 0.004 | 0.92 ± 0.05 | 0.91 ± 0.07 | 0.72 |
| Systolic blood pressure, mmHg | 119 ± 13 | 115 ± 10 | 0.23 | 120 ± 10 | 119 ± 17 | 0.73 |
| Diastolic blood pressure, mmHg | 76 ± 9 | 74 ± 7 | 0.92 | 76 ± 8.7 | 75 ± 9 | 0.81 |
| Lean Mass- BIO (kg) | 50.2 ± 12 | 50.6 ± 8.9 | 0.7 | 52.7 ± 12.5 | 48.3 ± 11.7 | 0.37 |
| Fat Mass- BIO (kg) | 20.2 ± 11.1 | 18.9 ± 8.7 | 0.93 | 21.5 ± 13.2 | 19 ± 9.3 | 0.85 |

Data are shown as mean ± SD. BIO: bioelectrical impedance. *p: comparison between NC-CAH vs controls. **p: comparison between NC-CAH genotypes. Values with statistical significance are in bold.

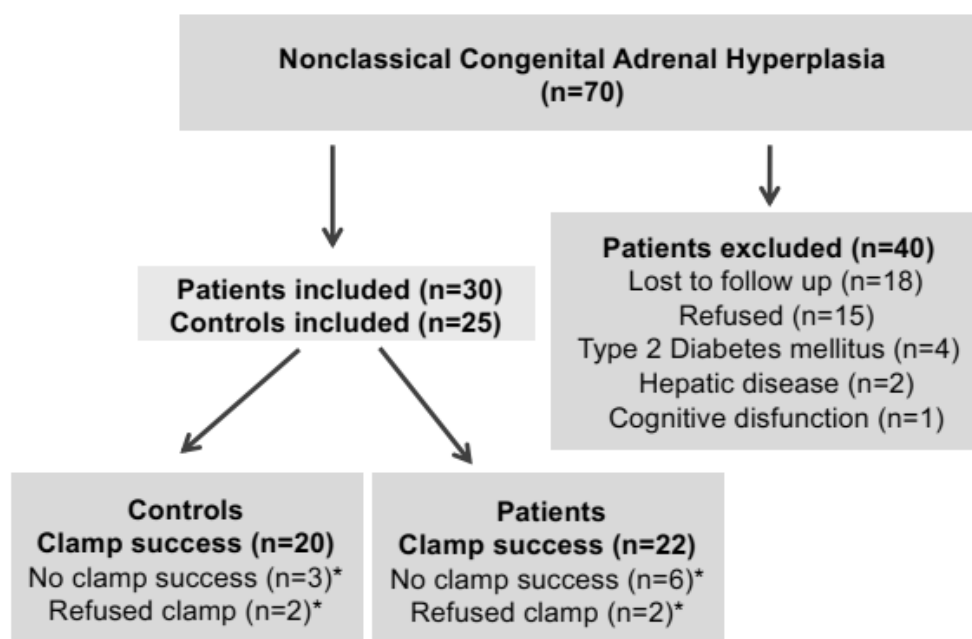
Accepted Manuscript

Table 2

| | NC-CAH | Controls | *p | NC/NC | C/NC | **p |
|--------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|------|
| N | 30 | 25 | | 15 | 13 | |
| Fasting glycemia, mmol/L | 4.4 ± 0.3 | 4.6 ± 0.4 | 0.02 | 4.4 ± 0.4 | 4.0 ± 0.3 | 0.62 |
| Hba1c, % | 4.9 ± 0.3 | 5.2 ± 0.4 | 0.006 | 4.9 ± 0.3 | 4.8 ± 0.3 | 0.65 |
| Fasting insulin, µIU/mL | 9 ± 8 | 6.8 ± 3.5 | 0.9 | 10.7 ± 9.8 | 7.6 ± 6.3 | 0.45 |
| HOMA-IR | 1.7 ± 1.7 | 1.3 ± 0.7 | 0.9 | 1.9 ± 1.8 | 1.4 ± 1.2 | 0.33 |
| Cholesterol, mg/dL | | | | | | |
| Total | 169 ± 35 | 176 ± 37 | 0.54 | 159 ± 32 | 180 ± 38 | 0.21 |
| HDL | 53 ± 13 | 61 ± 14 | 0.04 | 50 ± 12 | 54 ± 14 | 0.36 |
| LDL | 100 ± 26 | 100 ± 31 | 0.93 | 92 ± 27 | 110 ± 25 | 0.09 |
| Triglyceride, mg/dL | 82 ± 41 | 68 ± 32 | 0.2 | 83 ± 45 | 81 ± 36 | 0.89 |
| CRPhs, mg/dL | 0.37 ± 0.39 | 0.4 ± 0.35 | 0.77 | 0.39 ± 0.44 | 0.35 ± 0.35 | 0.71 |
| Leptin, ng/mL | 9.8 ± 8.5 | 8.4 ± 8.3 | 0.8 | 10 ± 7.8 | 8.9 ± 9 | 0.71 |
| Adiponectin, µg/dL | 236 ± 295 | 561 ± 527 | 0.03 | 217 ± 287 | 251 ± 321 | 0.9 |
| IL-6, pg/mL | 7.8 ± 11.6 | 20.1 ± 38 | 0.87 | 8.3 ± 11.4 | 7.6 ± 13 | 0.95 |
| TNF alpha, pg/mL | 2.2 ± 0.8 | 2.7 ± 1.6 | 0.69 | 2.4 ± 0.86 | 2.0 ± 0.74 | 0.27 |
| Mffm | 31.3 ± 20.2 | 55.6 ± 23.4 | 0.002 | 32.8 ± 22.9 | 27.9 ± 17.9 | 0.75 |
| Left CIMT, mm | 0.58 ± 0.22 | 0.51 ± 0.11 | 0.68 | 0.5 ± 0.15 | 0.66 ± 0.27 | 0.36 |
| Right CIMT, mm | 0.59 ± 0.22 | 0.46 ± 0.06 | 0.13 | 0.5 ± 0.11 | 0.68 ± 0.28 | 0.16 |

Data are shown as mean ± SD. CRPhs: C-reactive protein highly sensitive. M_{ffm} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) between 80- to 120-minutes in hyperinsulinemic-euglycaemic clamp. CIMT: carotid intima-media thickness. *p: comparison between NC-CAH vs controls. **p: comparison between NC-CAH genotypes. Values with statistical significance are in bold.

Figure 1



* Only basal data analyzed.

Figure 2

