VIVIAN DE OLIVEIRA MOURA

**Análise de genes moduladores do
fenótipo da forma não clássica da
deficiência da 21-hidroxilase**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Aparecida Sartori
Sanchez Bachega

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Moura, Vivian de Oliveira

Análise de genes moduladores do fenótipo da forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase / Vivian de Oliveira Moura. -- São Paulo, 2011.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Tânia Aparecida Sartori Sanchez Bachega.

Descritores: 1.Hiperplasia adrenal congênita 2.Hiperandrogenismo 3.Citocromos
4.Polimorfismo genético 5.Receptores androgênicos 6.Efeito modulador 7.5 alfa-
redutase tipo II

USP/FM/DBD-092/11

Este trabalho foi integralmente desenvolvido no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Dedico aos meus queridos pais Vera e Deneval, pelo apoio a todas as minhas decisões e por me darem o amor incondicional.

Dedico aos meus queridos irmãos Denilson e Gustavo, pelo amor, amizade e apoio em todos os momentos.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Berenice B. de Mendonça por seu exemplo de dedicação, competência, seriedade, profissionalismo e por acolher-me em seu serviço, com carinho e amizade permitindo-me realizar este trabalho.

À Profa. Dra. Tânia Aparecida Sartori Sanchez Bachega, pelo empenho dedicado à minha formação científica, pela amizade, estímulo e compreensão em momentos difíceis. Você foi muito mais do que uma orientadora, foi companheira e amiga. Muito Obrigada por tudo!

À Profa. Dra. Ana Cláudia Latrônico pelas sugestões e incentivos constantes.

Ao Prof. Dr. Alex Jorge pela colaboração nas análises estatísticas iniciais e pelos comentários sempre relevantes.

Ao Prof. Dr. Vinícius Brito pelas análises estatísticas iniciais e pelas sugestões em estatística.

À Profa. Dra. Luciani de Carvalho pelas valiosas discussões, pela amizade e por compartilhar seus conhecimentos em biologia molecular e suas experiências de vida.

À Profa. Dra. Regina Matsunaga pelo apoio e disponibilidade em ajudar sempre.

Ao Prof. Dr. José Marcondes pelas sugestões e por fornecer dados dos pacientes em acompanhamento em seu ambulatório.

Ao Diogo Bugano pela colaboração na realização da análise estatística final e orientação na interpretação dos resultados.

À Dra. Larissa Gomes e À Dra. Guiomar Madureira pela amizade e pelo atendimento dos pacientes no ambulatório médico.

Às secretárias Nilda e Cristiane pelo trabalho e apoio aos funcionários do laboratório LIM/42. À Miriam, Mariana, Cidinha pelo trabalho na organização do laboratório e pela disponibilidade em ajudar sempre.

Ao funcionário e amigo Ricardo Araújo pelas conversas bem humoradas ao final do dia, pela amizade e apoio constante.

À Laura Kaupert pela ajuda nas etapas iniciais do estudo de inativação do cromossomo X.

Ao Ricardo Paranhos pela amizade, incentivo e pela companhia agradável na bancada.

Aos queridos amigos do LIM/42 em especial: Acácio, Daiane, Cíntia, Thatiana, Michele, Luíza e Rosana.

Ao querido amigo Eduardo A. Pereira (Du) pelas dicas e correções de Língua Portuguesa desta dissertação, pelo carinho e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio e pela bolsa individual (08/51624-6).

Aos meus irmãos Denilson e Gustavo, meus grandes amigos, pelo companheirismo, pelo carinho e pelos momentos de diversão e muitas risadas.

Aos meus pais Vera e Deneval pelo incentivo constante, pela torcida e pelo amor em todos os momentos. Meu eterno agradecimento!

Um agradecimento especial a uma pessoa que esteve ao meu lado em todo o percurso deste trabalho. Sérgio, nestes últimos três anos você deu-me força e ânimo nos momentos em que eu mais necessitei, mas muito mais do que isso, você me ensinou a leveza da vida, como ninguém poderia me ensinar. Obrigada pelo carinho, dedicação e por tantos momentos felizes ao seu lado!

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

I. INTRODUÇÃO	1
1.1 Hiperplasia Adrenal Congênita por Deficiência da 21-Hidroxilase	3
1.2 Genética Molecular da Hiperplasia Adrenal Congênita por Deficiência da 21-hidroxilase	6
1.3 Receptor de Andrógenos	12
1.3.1 Trato Poliglutamina (CAG) do Gene do Receptor de Andrógenos	14
1.3.2 Inativação do Cromossomo X.....	15
1.3.3 O Trato Poliglutamina e a Inativação do Cromossomo X na Modulação do Fenótipo de Doenças Andrógeno-Dependentes	16
1.4 Gene 5 Alfa-Redutase Tipo 2.....	19
1.5 Enzimas Citocromais P450	21
1.5.1 Enzimas P450 Relacionadas à Metabolização da Testosterona.....	23
1.5.1.1 Citocromo P4503a5	23
1.5.1.2 Citocromo P4503a7	25
1.5.1.3 Citocromo P4503a4	27
1.5.1.4 Citocromo P4502c19	28
1.5.2 Enzimas P450 Relacionadas à Síntese da Testosterona	29
1.5.2.1 Citocromo P450c17	29
1.5.2.2 Citocromo P450 Óxido-Redutase	30
II. JUSTIFICATIVA	33
III. OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos Específicos.....	36
IV. CASUÍSTICA.....	37

V. MÉTODOS	41
5.1 Estudo Molecular	42
5.2 Estudo Molecular do Microssatélite CAG do Gene do Receptor de Andrógenos.....	43
5.3 Estudo da Inativação do Cromossomo X	44
5.4 Determinação do Desvio de Inativação do Cromossomo X	45
5.5. Pesquisa de Variantes Alélicas nos Genes <i>CYP3A5</i> , <i>CYP3A7</i> , <i>CYP3A4</i> , <i>CYP2C19</i> e <i>CYP17A1</i> , <i>POR</i> e <i>SRD5A2</i>	46
5.5.1 Ensaio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	46
5.5.2 Ensaio de Sequenciamento de DNA	48
5.5.3 Ensaio de PCR-RFLP	51
5.6 Análise Estatística.....	55
VI. RESULTADOS	57
6.1 Análise da Casuística de Acordo com a Gravidade do Genótipo da 21-Hidroxilase	58
6.2 Determinação da Frequência Alélica das Repetições CAG nas Pacientes com Forma Não Clássica e em Mulheres Normais	60
6.3 Distribuição da Frequência Alélica das Repetições CAG nos Pacientes com a Forma Não Clássica Divididos de Acordo com o Período de Manifestação do Fenótipo	61
6.4 Correlação do nCAG do <i>AR</i> e o Fenótipo de Forma Não Clássica.....	62
6.5 Frequência Alélica dos Polimorfismos dos Genes <i>CYP3A5</i> , <i>CYP3A7</i> , <i>CYP3A4</i> , <i>CYP2C19</i> e <i>CYP17A1</i> , <i>POR</i> e <i>SRD5A2</i>	64
6.6 Associação das Variantes Alélicas dos Genes <i>CYP3A5</i> , <i>CYP3A7</i> , <i>CYP3A4</i> , <i>CYP2C19</i> e <i>CYP17A1</i> , <i>POR</i> e <i>SRD5A2</i> com o Fenótipo da Forma Não Clássica	66
6.7 Análise de Grupos Familiares	68
VII. DISCUSSÃO	72
VIII. CONCLUSÕES	89
IX. ANEXOS.....	92
X. REFERÊNCIAS	121

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AF-1	Subdomínio de função de ativação 1
AF-2	Subdomínio de função de ativação 2
AF-5	Subdomínio de função de ativação 5
Andro	Androstenediona
AR	Receptor de andrógeno
C	Citosina
CAR	Receptor constitutivo androstano
CRH	Hormônio liberador da corticotrofina
<i>CYP</i>	Gene codificador do citocromo P450
DBD	Domínio de ligação ao DNA
Del	Deleção
DHEA	Deidroepiandrosterona
DHEAS	Sulfato de Deidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
F	Cortisol
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
Fram	<i>Frameshift</i>
G	Guanina

Grupo A	Mutações que conferem <2% de atividade residual da 21-OH
Grupo B	Mutações que conferem 3 a 7% de atividade residual da 21-OH
Grupo C	Mutações que conferem mais do que 20% de atividade residual da 21-OH
H	Homens
HAC	Hiperplasia Adrenal Congênita
IVS	Intron
Kb	Quilobases
kDa	kilo Dalton
Km	constante de Michaelis
LDB	Domínio de ligação ao hormônio e dimerização
M	Mulheres
mA	miliampere
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
nCAG	Número de repetições CAG
nt	nucleotídeo
NTD	Domínio N-Terminal
PCR	Reação em cadeia da polimerase
POR	P450 óxido-redutase
PS	Perdedor de sal
PSA	Antígeno prostático específico
PXR	Receptor X pregnano
P450	Enzimas que apresentam um pico (P) de absorbância no comprimento de onda de 450 nm.
Ref	Referência
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>

RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
Seq	Sequência
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
Sp1	Fator de transcrição Sp1
SV1	RNA _m variante 1 processado na presença do alelo <i>CYP3A5*3C</i>
<i>SRD5A2</i>	gene da 5 alfa-redutase tipo 2
SOP	Síndrome dos ovários policísticos
Sp	<i>Splice</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA
Testo	Testosterona
U	Unidade
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultravioleta
V	Volts
V _{max}	Velocidade máxima
17-OHP	17-hidroxi-progesterona
21-OH	21-hidroxilase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esteroidogênese adrenal.....	4
Figura 2.	Localização dos genes <i>CYP21</i> , dentro do <i>locus</i> dos genes do complexo principal de histocompatibilidade humana, no cromossomo 6p21.3.....	7
Figura 3.	Localização das dez mutações de ponto mais frequentes no gene <i>CYP21A2</i> em pacientes com deficiência da 21-hidroxilase em diferentes populações e as respectivas formas clínicas associadas.....	8
Figura 4.	Domínios funcionais da proteína do Receptor de Andrógenos.....	13
Figura 5.	Processo de inativação do cromossomo X.....	16
Figura 6.	Ação da enzima 5 alfa-redutase em tecidos periféricos.....	19
Figura 7.	Metabolismo da testosterona por enzimas dos citocromos hepáticos P450.....	22
Figura 8.	O <i>locus</i> da subfamília <i>CYP3A</i> localizado no cromossomo 7q21-q22.1, contém quatro genes <i>CYP3A4</i> , <i>CYP3A5</i> , <i>CYP3A7</i> , <i>CYP3A43</i> e três pseudogenes <i>CYP3AP1</i> , <i>CYP3AP2</i> e <i>CYP3AP3</i>	23
Figura 9.	RNAm processados na presença do polimorfismo A6986G no gene <i>CYP3A5</i>	24
Figura 10.	Representação esquemática da transferência de elétrons mediada pelo POR a partir do NADPH para as enzimas P450 tipo 2.	31
Figura 11.	Eletoferograma de produto de PCR do trato CAG do exon 1 do <i>AR</i> com amostras de DNA digerida e não digerida pela <i>HpaII</i> de uma mesma paciente heterozigota para o nCAG.....	118
Figura 12.	Eletoferogramas das reações de sequenciamento de amostra de DNA para o rastreamento do alelo <i>CYP3A5</i> *3C.....	49
Figura 13.	Eletoferogramas das reações de sequenciamento de amostra de DNA para o rastreamento do alelo <i>CYP3A5</i> *6.....	49

Figura 14. Eletroferogramas das reações de sequenciamento de amostra de DNA para o rastreamento do alelo <i>CYP3A5*1D</i>	49
Figura 15. Eletroferograma de reação de seqüenciamento de amostra de DNA para o rastreamento do alelo <i>CYP3A7*1C</i> (contendo as substituições: -188 G>T, -181 T>A, -179 T>C, -178 A>T, -167 T>G, -159 T>A e -129 A>C) em heterozigose	50
Figura 16. Eletroferogramas das reações de sequenciamento de amostra de DNA para o rastreamento do alelo <i>PORA503V</i>	50
Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo, dos produtos de restrição de PCR com a enzima <i>Rsa I</i> para rastreamento do alelo <i>SRD5A2 V89L</i>	52
Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, da restrição de produto de PCR com a enzima <i>Mnl I</i> para rastreamento do alelo <i>CYP2C19*17</i>	53
Figura 19. Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, da restrição com <i>MsPA I</i> de produto de PCR para pesquisa alelo A2 do gene <i>CYP17A1</i>	54
Figura 20. Histograma da distribuição alélica do nCAG do <i>AR</i> entre os pacientes com a forma não clássica e o grupo controle	119
Figura 21. Histograma da frequência alélica do nCAG do <i>AR</i> entre pacientes do grupo pediátrico, adulto e indivíduos assintomáticos	119
Figura 22. Histograma da frequência alélica de alelos curtos do nCAG do <i>AR</i> entre pacientes dos grupos adulto e pediátrico de acordo com genótipo A/C e C/C	120
Figura 23. Histograma da frequência alélica de alelos longos do nCAG do <i>AR</i> entre pacientes dos grupos adulto e pediátrico de acordo com o genótipo A/C e C/C	120
Figura 24. Média ponderada do nCAG do <i>AR</i> entre pacientes com a forma não clássica com e sem clitoromegalia	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1a.	Dados clínicos de pacientes com a forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase.....	93
Tabela 1b.	Dados hormonais dos pacientes com a forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase.....	96
Tabela 2.	Genótipo <i>CYP21A2</i> dos pacientes com a forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase.....	99
Tabela 3.	Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados nas reações de PCR e seqüenciamento	102
Tabela 4.	Número de repetições CAG do trato poliglutamina e o padrão de inativação do cromossomo X em pacientes com a forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase	103
Tabela 5.	Comparação do nCAG do <i>AR</i> entre os indivíduos normais e pacientes com a forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase, distribuídos de acordo com o início dos sintomas	106
Tabela 6.	Frequência de alelos curtos (≤ 18 repetições) e longos (≥ 26 repetições) do trato CAG do <i>AR</i> entre os indivíduos normais e pacientes com a forma não clássica, distribuídos de acordo com o início dos sintomas.....	107
Tabela 7.	Comparação entre as frequências de alelos curtos (≤ 18 repetições) e longos (≥ 26 repetições) do trato CAG do <i>AR</i> entre os grupos pediátrico e adulto dos diferentes genótipos da 21-hidroxilase.....	108
Tabela 8.	Comparação entre as frequências de alelos curtos (≤ 18 repetições) e longos (≥ 26 repetições) do trato CAG do <i>AR</i> entre os genótipos da 21-hidroxilase e os grupos pediátrico e adulto	109
Tabela 9.	Frequência de inativação randômica e de desvio de inativação do cromossomo X em pacientes heterozigotas para o nCAG do <i>AR</i> e em controles.....	110

Tabela 10. Frequência alélica dos polimorfismos dos genes relacionados à síntese, metabolismo e ação periférica dos andrógenos em diversas populações e no presente estudo	111
Tabela 11. Concentrações de testosterona (ng/dL) em mulheres adultas sintomáticas de acordo com o genótipo da 21-OH e dos genes relacionados à síntese e/ou metabolismo da testosterona	113
Tabela 12. Idade ao diagnóstico (anos) da forma não clássica de acordo com o genótipo da 21-OH e dos genes relacionados à síntese e/ou metabolismo da testosterona	114
Tabela 13. <i>Score</i> de Ferriman do hirsutismo ao diagnóstico de acordo com o genótipo da 21-OH e dos genes relacionados à síntese e/ou metabolismo	115
Tabela 14. Análise multigênica correlacionando as variantes alélicas, os sintomas, <i>score</i> de Ferriman, idade ao diagnóstico e o número de sintomas hiperandrogênicos	116
Tabela 15. Genótipos dos genes metabolizadores, do nCAG do <i>AR</i> e o padrão de inativação do cromossomo X entre os grupos familiares	117

RESUMO

Moura VO. *Análise de genes moduladores do fenótipo da forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 139p.

A deficiência da 21-hidroxilase é uma freqüente doença autossômica recessiva caracterizada por manifestações hiperandrogênicas, que se iniciam na infância, puberdade ou vida adulta. Observa-se existência de forte correlação do comprometimento da atividade enzimática conferido pelo genótipo com a forma clínica e com as concentrações basais e pós-estímulo da 17OH-progesterona. Entretanto, não se observa a mesma correlação com a intensidade, idade de início das manifestações e com as concentrações séricas de testosterona. Sugere-se que variações individuais na sensibilidade periférica aos andrógenos ou no metabolismo da testosterona poderiam estar implicadas na variabilidade fenotípica desta doença. Porém, os possíveis mecanismos nunca foram estudados na literatura. Os andrógenos têm sua ação mediada pelo receptor de andrógenos (AR), cujo gene apresenta um trato polimórfico de repetições CAG, o qual modula sua atividade de transativação. Em tecidos periféricos a ação androgênica pode ser ainda potencializada pela enzima 5 alfa-redutase, que transforma testosterona em dihidrotestosterona. O seu gene codificador (*SRD5A2*) possui vários polimorfismos que alteraram esta atividade de biotransformação nos tecidos periféricos. No *clearance* da testosterona, os citocromos hepáticos P4503a4, P4503a5 p4503a7 e P4502c19 são os principais envolvidos. Além disso, outro citocromo, o P450c17 representa uma enzima chave na via de produção de andrógenos. Para os citocromos P450 tipo 2, tanto da via de *clearance* como de síntese dos andrógenos, é necessário ainda a interação com o P450 óxido-redutase para realizar suas reações de hidroxilação. São descritos polimorfismos em todos os genes acima referidos, que alteram sua expressão ou a eficiência catalítica e, conseqüentemente, tem sido envolvidos na etiologia de doenças andrógeno-dependentes. Consideramos que alterações nos genes codificadores das proteínas relacionadas ao metabolismo e/ou ação periférica dos andrógenos possam atuar na modulação do fenótipo da forma não clássica. **Objetivos:** Correlacionar o nCAG do gene *AR* e os polimorfismos nos genes *CYP3A5*, *CYP3A7*, *CYP3A4*, *CYP2C19* e *CYP17A1*, *POR* e *SRD5A2* com a idade de aparecimento dos sintomas, *score* de Ferriman do hirsutismo ao diagnóstico, presença de virilização, com as concentrações séricas basais de testosterona, bem como com a ausência ou presença de sintomas. **Casuística:** Selecionamos 122 pacientes com diagnóstico de forma não clássica confirmado por 17OH-progesterona basal ou pós-estímulo com ACTH ≥ 10 ng/mL. Todos os pacientes tiveram o

diagnóstico molecular, ou seja, mutações identificadas nos dois alelos do gene *CYP21A2*. As pacientes foram divididas de acordo com o comprometimento da atividade da 21-OH predito pelo genótipo em grupos A/C (grave) e C/C (moderado). As pacientes também foram divididas em grupos pediátrico e adulto, início das manifestações antes e após os 12 anos, respectivamente. **Metodologia:** O DNA foi extraído de leucócitos periféricos. As regiões de repetições CAG foram amplificadas por PCR e os produtos submetidos à eletroforese capilar e análise pelo *software* GeneScan. Amostras de DNA das pacientes heterozigotas para o número de repetições CAG foram digeridas com a enzima *Hpa II* e os produtos submetidos à amplificação da região CAG para se determinar o padrão de inativação do cromossomo X. Os genes *CYP3A5*, *CYP3A4*, *CYP3A7*, *CYP17A1*, *CYP2C19*, *POR* e *SRD5A2* foram amplificados por PCR e submetidos à reação de seqüenciamento ou à reação de digestão enzimática para rastreamento das variantes alélicas. Os resultados foram comparados com as respectivas seqüências selvagens depositadas no *GeneBank*. Na análise estatística foram empregados os testes t de Student, ANOVA, Wilcoxon rank-sum, Kruskal Wallis rank e regressão linear. **Resultados:** Observamos uma frequência significativamente menor de alelos longos (> 26 repetições) do trato CAG do AR no grupo pediátrico em relação ao de adultos com genótipo 21-OH do grupo C/C ($p=0,01$). Adicionalmente, a média ponderada do trato CAG foi significativamente menor nas pacientes com clitoromegalia ($19,1 \pm 2,7$) em comparação com a de pacientes sem virilização ($21,6 \pm 2,5$), correlação que independeu do genótipo da 21-OH. A mediana das concentrações séricas de testosterona foi significativamente maior nas carreadoras da variante *CYP17A1**A2 (145,7 ng/dL, 126-153) em relação às carreadoras da variante selvagem (57 ng/dL, 36-87) com genótipo 21-OH do grupo A/C. As demais variantes não se correlacionaram com os fenótipos clínico e hormonal. **Conclusão:** Observamos que o trato CAG apresentou efeito na modulação do fenótipo de virilização de mulheres com forma não clássica. Além disso, o trato CAG pode ter contribuído no período de início das manifestações, uma vez que o grupo pediátrico com genótipo C/C teve frequência menor de alelos longos em relação às adultas. Dentre as variantes alélicas pesquisadas, que alteram a síntese e/ou metabolismo dos andrógenos, identificamos associação do alelo *CYP17A1**A2 com concentrações maiores de testosterona. Embora tenhamos avaliado uma casuística expressiva para esta patologia, para as demais correlações com resultados negativos, não podemos afastar um efeito do tamanho da amostra.

Descritores: 1.Hiperplasia adrenal congênita 2.Hiperandrogenismo 3.Citocromos 4.Polimorfismo genético 5.Receptores androgênicos 6.Efeito modulador 7.5 alfa-redutase tipo II

SUMMARY

Moura VO. *Analysis of genes modulators in the nonclassical 21-hydroxylase deficiency phenotype* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 139p.

Introduction: The 21-hydroxylase deficiency is a common autosomal recessive disease characterized by clinical hyperandrogenism, which could begin at childhood, puberty or adulthood. There is a strong correlation among impairment of enzymatic activity conferred by genotypes, clinical forms, basal and post-stimulation 17OH-progesterone (17-OHP) levels. However, we did not observe the same correlation with the intensity, age at onset of manifestations and basal testosterone levels. It is suggested that individual variations in the androgen peripheral sensitivity and/or metabolism could be implicated in the phenotypic variability of this disease. However, potential mechanisms have never been studied before. The androgen action is mediated by the androgen receptor (AR), whose gene has a polymorphic CAG repeat that modulates its transactivation activity. In the peripheral tissues, the androgen action is modified by the 5 alpha-reductase type 2 activity, which converts testosterone into a potent androgen, dihydrotestosterone. Its coding gene (*SRD5A2*) carries several polymorphisms altering its catalytic activity in the peripheral tissues. Regarding the testosterone clearance, hepatic cytochromes P4503a4, P4503a5 p4503a7 P4502c19 are the most important. In addition, another cytochrome, P450c17, is a key enzyme in the androgen production pathway. For the cytochrome P450 type 2 activities, involved in the androgen clearance and/or synthesis, an interaction with the P450 oxidoreductase is still necessary. Polymorphisms are described in all the aforementioned genes, which change their expression and/or catalytic efficiencies; consequently, they have been implicated in the etiology of androgen-dependent diseases. We supposed that changes in the coding genes for the aforesaid proteins could act in modulating the nonclassical phenotype.

Objectives: To compare the nCAG of *AR* gene and polymorphisms of *CYP3A5*, *CYP3A7*, *CYP3A4*, *CYP2C19*, and *CYP17A1*, *SRD5A2* and *POR* genes with the age of onset of symptoms, Ferriman score of hirsutism at diagnosis, presence of virilization, basal testosterone levels, as well as with the absence or the presence of symptoms. **Patients:** We selected 122 patients with basal or post-ACTH 17-OHP ≥ 10 ng/mL. All patients had confirmed nonclassical molecular diagnoses. Patients were divided according to the impairment of 21-OH activity predicted by genotype groups into A/C (severe) and C/C (moderate). Patients were also classified according to the onset of manifestations into pediatric and adult groups, younger than or older than 12 years, respectively. **Methods:** DNA was extracted from peripheral leukocytes. CAG repeat regions were PCR amplified, products submitted to capillary electrophoresis and analyzed by GeneScan software. DNA samples from CAG heterozygous patients were digested with the *Hpa II* enzyme and also submitted to PCR, in order to determine X-chromosome inactivation pattern. The *CYP3A5*, *CYP3A4*, *CYP3A7*, *CYP17A1*, *CYP2C19*, *POR* and

SRD5A2 genes were PCR amplified and submitted to sequencing or enzymatic assays to screen the allelic variants. The results were compared with their wild sequences in the GenBank. Statistical comparisons employed Student's t tests, ANOVA, Wilcoxon rank-sum, Kruskal Wallis rank and linear regression. **Results:** We observed a significantly lower frequency of longer CAG alleles (> 26 repeats) of *AR* in the pediatric group compared to the adults carrying the 21-OH genotype from group C/C ($p = 0.01$). Additionally, the weighted biallelic mean of the CAG tract was considerably lower in patients with clitoromegaly (19.1 ± 2.7) in comparison to patients without it (21.6 ± 2.5), a correlation that was independent of the 21-OH genotype severity. The median of testosterone levels was significantly higher in the *CYP17A1**A2 carriers (145.7 ng/dL, 126-153) compared to the ones carrying the wild allele (57 ng/dL, 36-87), from the group A/C of 21-OH genotype. The other variants did not show a correlation with clinical and hormonal phenotypes. **Conclusions:** We observed that the CAG tract was effective in modulating the phenotype of virilization in nonclassical women as well as influenced the period of onset of manifestations of patients carrying moderate *CYP21A2* genotype. Considering the remaining allelic variants, which alter the androgen synthesis or metabolism, we identified the association of *CYP17A1**A2 alleles with higher testosterone levels. Although we evaluated a significant number of patients with 21-OHD, we cannot rule out a sample size effect.

Descriptors: 1.Congenital adrenal hyperplasia 2.Hyperandrogenism
3.Cytochromes 4.Genetic polymorphism 5.Androgens Receptors
6.Modulator Effect 7.5 alpha-reductase type 2

I. INTRODUÇÃO

A produção dos hormônios esteróides adrenais é caracterizada por uma série de reações de hidroxilação mediada por monoxigenases da família do citocromo P450. Sua regulação é realizada por fatores circulantes, tais como o sistema CRH-ACTH-glicocorticóide e o renina-angiotensina-aldosterona, os quais operam à distância de seu sítio de síntese; e também pela eficiência catalítica das enzimas envolvidas na esteroidogênese adrenal (Miller, 1988; 2005).

Os hormônios esteróides basicamente são divididos em cinco grupos: glicocorticóides, mineralocorticóides, progestágenos, esteróides e andrógenos. Dentre os com atividade glicocorticóide, o cortisol é o principal, e para sua síntese são necessárias as enzimas: 20-22 colesterol-desmolase, 17 α -hidroxilase, 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase, 21-hidroxilase (21-OH) e 11 β -hidroxilase. A perda de atividade enzimática de qualquer uma destas enzimas resulta em déficit na biossíntese de cortisol e aumento da secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que estimula cronicamente as adrenais, e conseqüentemente resulta no aparecimento de um grupo de doenças denominadas de hiperplasia adrenal congênita (HAC) (White & Speiser 2000).

1.1 Hiperplasia Adrenal Congênita por Deficiência da 21-Hidroxilase

Aproximadamente 90-95% dos casos de HAC são causados pela deficiência da enzima 21-hidroxilase (New *et al.*, 1989). A diminuição da atividade desta enzima prejudica a conversão da progesterona em desoxicorticosterona na camada glomerulosa do córtex adrenal e da 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) em desoxicortisol na camada fasciculada, com conseqüente diminuição da síntese de cortisol (**Figura 1**). A produção prejudicada do cortisol causa uma elevação crônica do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), resultando em hiperplasia do córtex da adrenal e em excesso da produção dos precursores do cortisol. Na ausência de uma adequada 21-hidroxilação, estes esteróides são desviados para a síntese dos andrógenos adrenais, causando os sinais de virilização característicos da doença (Merke *et al.*, 2005; Saroj *et al.*, 2009; Trakakis *et al.*, 2009).

Figura 1. Esteroidogênese adrenal. Na ausência da atividade de 21-hidroxilação há diminuição da síntese de cortisol e desvio de seus precursores para a síntese dos andrógenos adrenais.

A sintomatologia varia de acordo com o sexo, intensidade do comprometimento da atividade da 21-hidroxilase e idade de início dos sintomas. São reconhecidas quatro formas clínicas da hiperplasia adrenal congênita por deficiência da 21-hidroxilase (HAC-21OH): a forma clássica, subdividida em formas perdedora de sal e virilizante simples, e a forma não clássica, que é subdividida em sintomática e assintomática ou críptica (Admoni *et al.*, 2009; Jeske *et al.*, 2009)

A forma clássica é subdividida em virilizante simples e perdedora de sal. A forma virilizante simples caracteriza-se por graus variados de virilização pré-natal da genitália externa no sexo feminino e virilização pós-natal em ambos os sexos, com aumento do clitóris ou pênis, pubarca precoce e avanço da idade óssea com prejuízo na estatura final. A forma perdedora de sal, além da hiperprodução androgênica da forma anterior, apresenta deficiência mais grave na produção de aldosterona, o que resulta em desidratação com hiponatremia e hiperpotassemia geralmente nos primeiros trinta dias de vida, e quando não tratada resulta em choque e óbito (Speiser & White 2003; Pasqualini *et al.*, 2007).

A forma não clássica é subdividida em sintomática ou assintomática. A forma sintomática não apresenta virilização pré-natal e os sintomas iniciam-se em épocas variáveis, podendo resultar em pubarca precoce, amenorréia primária ou secundária, hirsutismo, acne e infertilidade. A forma não clássica assintomática apresenta o mesmo perfil hormonal da forma sintomática, porém sem manifestações clínicas, sendo geralmente diagnosticada na investigação dos familiares de um paciente (Moran & Azziz, 2003; Escobar-Morreale *et al.*, 2008; Kashimada *et al.*, 2008).

A prevalência da forma clássica da HAC-21OH é estimada em 1:5.000 a 1:20.000 nascimentos, mas pode variar consideravelmente entre os diferentes grupos étnicos. A forma não clássica tem prevalência mais alta, afetando aproximadamente 1 a 2% da população caucasiana (Pang *et al.*, 1988; Silveira *et al.*, 2009; White PC, 2009).

A anormalidade bioquímica mais evidente nos pacientes com HAC-21OH é a elevação da 17-OHP, o principal substrato da enzima, que geralmente está em concentrações séricas superiores a 50 ng/mL na forma clássica (Bachega *et al.*, 2004). Na forma não clássica as concentrações basais da 17-OHP podem estar elevadas ou normais. Quando normais, torna-se necessário a realização do teste de estímulo com ACTH sintético (250 µg I.V.). Valores da 17-OHP 60 minutos após o estímulo com ACTH maiores ou iguais à 10 ng/mL confirmam este diagnóstico. Outros hormônios que também estão elevados em pacientes não tratados com HAC-21OH incluem progesterona, androstenediona e testosterona (New *et al.*, 1983).

Observa-se que a deficiência da 21-hidroxilase apresenta um espectro na sua deficiência enzimática, resultando em formas clínicas com diferentes gravidades, as quais podem ser justificadas pela presença de várias mutações no gene *CYP21A2*, que codifica a enzima (Dolzan *et al.*, 2005).

1.2 Genética Molecular da Hiperplasia Adrenal Congênita por Deficiência da 21-hidroxilase

O gene *CYP21A2*, que codifica a enzima 21-OH, está localizado no *locus* do complexo principal de histocompatibilidade humana, no braço curto do cromossomo 6, região 6p21.3, especificamente dentro do *locus* de genes que codificam o HLA classe III. Existem dois genes para a 21-hidroxilase, um

ativo (*CYP21A2*) e um pseudogene (*CYP21A1P*), os quais são 98% homólogos nas regiões exônicas e 96% nas regiões intrônicas, o último não codifica a proteína devido à presença de várias mutações que o tornam inativo. Ambos estão duplicados em cadeia com o *locus* dos genes *C4*, adjacentes, e alternando com os genes *C4A* e *C4B* (**Figura 2**) (Bojunga *et al.*, 2005; Gonçalves *et al.*, 2007; Parajes *et al.*, 2008).

Figura 2. Localização dos genes *CYP21*, dentro do *locus* dos genes do complexo principal de histocompatibilidade humana, no cromossomo 6p21.3. Números identificam as distâncias entre genes em quilopares de bases. Abaixo: Mapa da região ao redor dos genes da 21-hidroxilase (*CYP21*). O pseudogene é identificado como *CYP21A1P* e o gene ativo *CYP21A2*. *C4A* e *C4B*, genes do quarto componente do complemento sérico. *RP1*, gene de uma proteína quinase nuclear; *RP2*, uma cópia truncada deste gene; *TNXB*, gene da Tenascina-X; *TNXA*, uma cópia truncada deste gene. Os genes *TNX* estão em fitas cromossômicas opostas e as setas indicam o sentido da transcrição. Adaptado de White & Speiser, 2000

Esta região de genes duplicados com extremo grau de identidade de nucleotídeos favorece o emparelhamento desigual dos genes homólogos durante a meiose, predispondo ao aparecimento de mutações. Estas mutações incluem deleções, grandes conversões gênicas ou microconversões, tendo sido descritas até o momento mais de 127 mutações de ponto na deficiência da 21-hidroxilase. Dentre as mutações, dez são mais frequentes: P30L (exon 1), IVS2-13 A/C>G (I2 Splice), G110Δ8nt (Del de 8 nt no exon 3), I172N (exon 4), Cluster de I236N, V237E, M239K (exon 6), V281L (exon 7), F306+T (exon 7), Q318X (exon 8), R356W (exon 8), P453S (exon 10) (**Figura 3**). Estas mutações didaticamente são divididas em três grupos de acordo com o comprometimento enzimático observado em estudos *in vitro* (Speiser *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 2007).

Figura 3. Localização das dez mutações de ponto mais frequentes no gene *CYP21A2* em pacientes com deficiência da 21-hidroxilase em diferentes populações e as respectivas formas clínicas associadas. PS: Perdedor de sal; VS: Virilizante simples; NC: Não clássica.

O grupo A inclui mutações que abolem a atividade enzimática ou que conferem < 2% de atividade residual da 21-OH. As mutações que conferem 3 a 7% de atividade residual são segregadas no grupo B. As mutações que acarretam menor comprometimento, ou seja, mais do que 20% de atividade residual, são incluídas no grupo C. Em geral, pacientes homozigotos para as mutações do grupo A apresentam fenótipo da forma clássica perdedora de sal, homozigotos para as mutações do grupo B (genótipo B/B) ou ainda em heterozigose composta com as do grupo A (A/B) manifestam a forma virilizante simples e, finalmente, indivíduos homozigotos para as mutações do grupo C (genótipo C/C) ou em heterozigose composta com as dos grupos anteriores (genótipos A/C ou B/C) exibem fenótipo da forma não clássica (Speiser *et al.*, 1992; Bachega *et al.*, 1998; Akhmetova *et al.*, 2008).

Os indivíduos com a deficiência da 21-hidroxilase apresentam geralmente mutações diferentes em cada um dos alelos (heterozigotos compostos) e com menor frequência são homozigotos para uma mutação. Em um heterozigoto composto, a forma clínica é conferida pelo alelo que carrega a mutação que causa menor comprometimento da atividade enzimática (Bachega *et al.*, 2000; Krone & Arlt, 2009).

Comumente observa-se uma forte correlação do genótipo com as formas clínicas, com as concentrações de 17OH-progesterona e de testosterona (Witchel *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2003). Entretanto, apesar das correlações descritas, não se observa correlação entre comprometimento enzimático conferido pelo genótipo com a intensidade das manifestações hiperandrogênicas (Bachega *et al.*, 2000; 2004)

Especificamente na forma não clássica, os estudos de correlação do genótipo com o fenótipo identificaram diferenças significativas entre os valores da 17-OHP, basal e após estímulo com ACTH, de acordo com a gravidade do genótipo (Bachega *et al.*, 2000; Speiser *et al.*, 2000; Deneux *et al.*, 2001). Identificamos também em nossa casuística uma tendência de pacientes portadores do genótipo mais grave (A/C) apresentarem os sinais de hiperandrogenismo mais precocemente do que os com genótipo com comprometimento menor (C/C). Porém, notamos que há uma sobreposição entre os dois grupos, uma vez que observamos indivíduos com pubarca precoce portando o genótipo de menor gravidade (C/C) e indivíduos apresentando hirsutismo de início na idade adulta ou mesmo mulheres assintomáticas portando o genótipo de maior gravidade (A/C) (Bachega *et al.*, 2000; 2004).

Similarmente, Speiser *et al.* (2000) analisaram um grupo de 34 mulheres com a forma não clássica em estudo multicêntrico, e observaram que no grupo das pacientes portadoras do genótipo A/C houve elevada prevalência de hirsutismo e de oligomenorréia em comparação com as pacientes com genótipo C/C. Porém, os autores não observaram diferença significativa na prevalência de amenorréia ou de infertilidade entre os dois grupos, bem como também identificaram pacientes com genótipo C/C com fenótipo hiperandrogênico grave ou ainda semelhante ao do grupo com maior comprometimento enzimático (A/C).

Esta diversidade na intensidade das manifestações hiperandrogênicas também é observada até mesmo em uma mesma irmandade, situação na

qual os afetados possuem o mesmo genótipo. Roux *et al.* (1995) descreveram duas irmãs com a forma não clássica e homozigotas para a mutação V281L; uma delas apresentou hirsutismo grave e clitoromegalia, enquanto que a outra manifestou apenas hirsutismo moderado.

Embora as concentrações de 17-OHP sejam comumente maiores nos pacientes com genótipo A/C em relação aos com genótipo C/C, Deneux *et al.* (2001) demonstraram que a frequência das características hiperandrogênicas não diferiu entre os dois grupos genotípicos: hirsutismo (grupo A/C 97% *versus* C/C 94%), oligomenorréia (A/C 48,5% *versus* C/C 44,4%). Os autores concluíram que a gravidade do genótipo da forma não clássica não prediz as manifestações hiperandrogênicas.

Similarmente, nos portadores de mutações da forma não clássica em homozigose é observada uma ampla variabilidade fenotípica: Krone *et al.*, (2000) relataram que alguns portadores da mutação P30L apresentavam fenótipo de forma virilizante simples, o qual é predito por mutações do grupo B; enquanto que, Speiser *et al.*, (2000), descreveram pacientes carreadores da mutação V281L com fenótipos que variavam desde portadores de infertilidade a assintomáticos.

É indiscutível que há uma boa correlação do genótipo com a forma clínica na deficiência da 21-hidroxilase. Contudo, a concordância do genótipo com sintomas hiperandrogênicos ainda precisa ser compreendida; por isso, torna-se importante a análise de mecanismos genéticos que poderiam explicar as diferentes manifestações clínicas ou ainda as diferenças marcantes na idade

da apresentação dos sintomas entre os pacientes carreadores de um genótipo predizendo semelhante comprometimento da atividade enzimática.

Nas situações descritas acima, a literatura sugere que as manifestações hiperandrogênicas possam depender de outras variáveis, tais como da atividade local da enzima 5 alfa-redutase, a qual converte testosterona em um hormônio mais potente, a dihidrotestosterona; da atividade do receptor de andrógenos em tecido específico, e de diferenças individuais na metabolização de andrógenos (Krone *et al.*, 2000; White & Speiser, 2000). Entretanto, as possíveis variações genéticas que poderiam estar modulando o fenótipo da forma não clássica nunca foram investigadas.

1.3 Receptor de Andrógenos

Os andrógenos, Testosterona e seu metabólito dihidrotestosterona (DHT) exercem seus efeitos através da interação com o receptor de andrógenos (AR), cuja expressão ocorre em vários tecidos, inclusive órgãos sexuais primários e secundários (Gelman *et al.*, 2002).

O gene do AR está localizado no cromossomo X, na região Xq11-12, possui 75-90 kB, compreendendo 8 exons separados por introns que variam de 0,7 a mais de 26 kB de tamanho. Sua proteína é formada por uma região de aproximadamente 918 aminoácidos, com peso molecular de 110 kDa (Dehm *et al.*, 2007).

A proteína do *AR* é dividida em quatro domínios funcionais: **1)** região amino-terminal contendo os subdomínios AF-1, responsável pela ativação transcricional dependente de ligante; e AF-5, pela atividade transcricional constitutiva; **2)** um domínio de ligação ao DNA que contém os dedos de zinco (*zinc fingers*), esta região é a mais conservada e garante a especificidade à proteína; **3)** uma região *hinge*, responsável pelo transporte do complexo receptor-ligante ao núcleo e **4)** uma região carboxi-terminal, que medeia as interações com as proteínas *heat shock*, a dimerização do receptor e a ligação ao ligante. Esta região apresenta um subdomínio com função de ativação dependente da ligação do andrógeno, denominada AF-2 (Reid *et al.*, 2003; Dehm *et al.*, 2007) (**Figura 4**).

Figura 4. Domínios funcionais da proteína do Receptor de Andrógenos. NTD: Domínio N-Terminal; AF1 e AF5: Domínios de transativação; DBD: Domínio de ligação ao DNA; H: Domínio *Hinge* (dobradiça) responsável pela interação com o DNA e translocação nuclear; LBD: Domínio de ligação ao hormônio e dimerização; AF2: Domínio de transativação; (Gln)n: *Locus* do trato polimórfico de repetições glutamina; (Pro): *Locus* do trato de repetições de prolina; (Gly)n: *Locus* do trato polimórfico de repetições de glicina

O domínio ativador da transcrição é constituído por 555 aminoácidos e possui uma extensão correspondente a mais da metade da proteína, sendo codificado pelo primeiro exon. Esta região do receptor contém tratos homopoliméricos dos aminoácidos **prolina** (Pro), **glutamina** (Gln) e **glicina** (Gly), sendo os dois últimos tratos polimórficos (Reid *et al.*, 2003).

1.3.1 Trato Poliglutamina (CAG) do Gene do Receptor de Andrógenos

A extensão polimórfica de glutamina localiza-se a partir do códon 58 e é codificada pelo trinucleotídeo CAG. Foi observado que o trato poliglutaminas parece não afetar a afinidade de ligação aos andrógenos, mas pode modificar a atividade de transativação do receptor, existindo uma correlação inversa do número de repetições CAG com a atividade de transativação (Tut *et al.*, 1997; Chamberlain *et al.*, 1994).

Existem aproximadamente vinte tamanhos diferentes de alelos para o número de repetições CAG (nCAG), havendo variações étnicas quanto à distribuição alélica (Allen *et al.*, 1992). Avaliamos na população normal brasileira o número de repetições CAG, e este variou de 10 a 31, sendo que 90% das mulheres são heterozigotas para este número (Rocha *et al.*, 2008).

Considerando que o gene do *AR* localiza-se no cromossomo X, em mulheres, torna-se necessário saber qual dos alelos está no cromossomo X ativo, o que será explicado a seguir.

1.3.2 Inativação do Cromossomo X

No início do desenvolvimento das fêmeas de mamíferos, um dos cromossomos X fica inativo em cada célula. Esta inativação iguala a expressão dos genes ligados ao cromossomo X entre os dois sexos, sendo um mecanismo de compensação de dose gênica (Lyon *et al.*, 1961). A região promotora de muitos genes localizados no cromossomo X inativo é modificada pela adição de um grupo metil à citosina, restrita aos dinucleotídeos CpG, pela enzima DNA metiltransferase.

A escolha do cromossomo X que será inativado é geralmente um evento casual e ocorre precocemente na embriogênese, na fase de blastocisto (**Figura 5**). A manutenção estável da inativação do cromossomo X, através das divisões celulares subseqüentes, resulta em fêmeas com mosaicos fenotípicos para os cromossomos X paterno e materno.

Figura 5. Processo de inativação do cromossomo X. Durante a fase de blastocisto ocorre o processo de inativação de um dos cromossomos X no sexo feminino a fim de se igualar a expressão gênica com o sexo masculino em mamíferos. O padrão de inativação é aleatório e fixado para as células descendentes, criando assim um mosaico de células quanto ao cromossomo X que foi inativado no adulto. X^p : X paterno ativo; X^m : X materno ativo; ●: representa o X paterno condensado; ●: representa o X materno condensado

1.3.3 O Trato Poliglutamina e a Inativação do Cromossomo X na Modulação do Fenótipo de Doenças Andrógeno-Dependentes

A pesquisa por genes que influenciam a carcinogênese prostática, doença também dependente de ação androgênica, contribuiu na identificação de marcadores genéticos que predisõem ao desenvolvimento do câncer. Neste sentido vários trabalhos foram

realizados associando o trato poliglutamina ao risco de ocorrência do câncer de próstata. A maioria dos estudos observaram que os indivíduos carreadores de alelos com número menor do que 21 repetições tinham maior chance de desenvolver a neoplasia, bem como em idade de início mais precoce. Alguns destes autores sugerem considerar este *locus* como um dos marcadores genéticos da doença (Hardy *et al.*, 1996; Bratt *et al.*, 1999; Hsing *et al.*, 2000; Silva Neto *et al.*, 2008).

O hirsutismo, excesso de pêlos em mulheres, é considerado uma doença decorrente do excesso dos andrógenos. Entretanto, mulheres com hirsutismo idiopático possuem concentrações séricas normais de andrógenos. Propõe-se, como mecanismo potencial, uma sensibilidade aumentada dos tecidos-alvos aos andrógenos, tendo sido identificada uma associação com número menor de repetições CAG. Outro mecanismo proposto é a inativação preferencial dos alelos com número maior de repetições CAG, consequentemente permitindo que os alelos menores (≤ 18 repetições) ficassem mais ativos (Vottero *et al.*, 1999).

Similarmente aos achados de pacientes com hirsutismo idiopático, Lappalainen *et al.*, (2008) identificaram em amostra de 73 pacientes com pubarca precoce idiopática uma diferença significativa na frequência de tratos CAG menores em comparação aos do grupo controle. A diferença foi maior quando os dados da inativação do cromossomo X foram considerados.

Especificamente, na deficiência da 21-hidroxilase existem apenas dois estudos que analisaram a influência das repetições CAG do AR e a correlacionaram com o fenótipo; porém, apenas em pacientes portadoras da forma clássica (Giwerzman *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2008). Estes trabalhos decorreram dos achados prévios de estudos populacionais, que identificaram forte correlação do genótipo com a forma de manifestação clínica, porém, não com o grau de virilização da genitália externa. Apenas o segundo estudo, que avaliou casuística significativa, demonstrou uma influência do número de repetições CAG na modulação do grau de virilização genital.

As evidências acima sugerem que o trato CAG do AR pode estar envolvido na variabilidade fenotípica da forma não clássica. Entretanto, até o momento nenhum estudo avaliou esta associação.

Outra possibilidade de interação com o fenótipo hiperandrogênico é a biotransformação dos andrógenos para compostos mais ativos como a DHT, através da ação da enzima 5 alfa-redutase, ou ainda, para compostos menos ativos (metabólitos 6 β e 16 β reduzidos) através de ação de citocromos P450 hepáticos. Sabe-se que SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) nos genes codificadores das enzimas supracitadas são responsáveis pela variabilidade interindividual de metabolização de compostos endógenos e/ou xenobióticos (Makridakis *et al.*, 1999; Lamba *et al.*, 2002).

1.4 Gene 5 Alfa-Redutase Tipo 2

A síntese de dihidrotestosterona (DHT) é catalisada por enzimas microssomais NADPH-dependente, 5 alfa-redutase tipo 1 e 5 alfa-redutase tipo 2, as quais realizam reações de oxi-redução em esteróides C19 e C21, incluindo principalmente a testosterona e a androstenediona. A DHT é o andrógeno mais potente produzido nos homens e mulheres e é considerada como um produto predominantemente de formação periférica, podendo ser formada em vários tecidos não endócrinos, mas principalmente na pele e tecidos sexuais como próstata e a pele da genitália externa feminina (Zhu & Sun *et al.*, 2005) (**Figura 6**).

Figura 6. Ação da enzima 5 alfa-redutase em tecidos periféricos. A conversão da Testosterona (T) em Dihidrotestosterona (DHT) provoca uma mudança conformacional na molécula que faz com que a DHT se encaixe ao receptor de andrógeno em um sítio diferente do qual se liga a testosterona. Assim, a DHT e a T interagem seletivamente com os receptores de andrógenos nas células de tecidos periféricos, tais como a pele genital e nos fibroblastos

A isoenzima 5 alfa-redutase tipo 2 é uma proteína formada de 254 aminoácidos, cujo gene *SRD5A2* localiza-se no cromossomo 2p23-22 e possui maior afinidade pela testosterona ($KM = 0.004-1 \mu M$) do que a sua isoforma tipo 1 ($KM = 1-5 \mu M$). Estudos de pacientes com câncer de próstata em vários grupos étnicos sugerem que as variantes alélicas no gene da 5 alfa-redutase tipo 2 possam ser associadas com maior risco para o desenvolvimento de câncer de próstata, bem como com progressão mais rápida (Makridakis *et al.*, 1997).

Nam *et al.*, (2001) investigaram um polimorfismo *missense*, V89L, o qual substitui o aminoácido leucina por valina na posição 89 e acarreta redução de 30% na conversão da testosterona para DHT. Os autores avaliaram 320 homens submetidos à investigação do câncer de próstata, e descobriram que o *odds ratio* para ter câncer de próstata ou progressão mais rápida da doença em homens carreadores de pelo menos um alelo V foi de 2,53 e 3,32, respectivamente, em comparação com os de homens com o genótipo homozigoto mutante L/L ($p = 0,03$ e $p = 0,0006$). Esta variante também foi estudada em casuística de mulheres normais e portadoras de SOP e identificou-se que o alelo L é um fator genético protetor contra o desenvolvimento de SOP (Goordazi *et al.*, 2006).

Outra alteração *missense*, substituindo alanina por um resíduo de treonina na posição 49 (Makridakis *et al.*, 1999) causa um aumento de oito vezes no V_{max} (velocidade máxima) da atividade 5 alfa-redutase tipo 2, e foi associada com maior risco de câncer de próstata em afro-americanos e hispânicos. Além disso, a mesma variante também foi

associada com uma maior frequência de doença invasiva extra-capsular e de metástases, e conseqüentemente com um pior prognóstico no câncer de próstata (Jaffe *et al.*, 2000).

1.5 Enzimas Citocromais P450

As enzimas P450 são classificadas em famílias e subfamílias pela semelhança de seus genes, sendo estes genes designados pelo prefixo *CYP*. Postula-se que as famílias *CYPs* tenham surgido por mecanismos de duplicação e conversão gênica, durante eventos de *crossing over* desigual. No genoma humano existem 57 genes *CYP* ativos e 58 pseudogenes (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2005).

A subfamília do *CYP3A* representa 50% do total dos citocromos expressos no fígado e destaca-se pelo metabolismo de amplo espectro de substratos. O *CYP3A* é responsável pela metabolização de mais de 60% dos fármacos conhecidos e de muitos compostos endógenos, como os hormônios esteróides, ácidos graxos e vitaminas lipossolúveis (Lamba *et al.*, 2002).

Embora os genes *CYP3A4*, *CYP3A5* *CYP3A7* codifiquem os principais citocromos envolvidos no *clearance* da testosterona, há também o gene *CYP2C19* que responde por parte desta metabolização. Outros citocromos P450 estão presentes também na via de produção da testosterona, na esteroidogênese, por exemplo, o *CYP17A1* que codifica uma enzima chave

na via de produção de esteróides sexuais, tanto nas gônadas como nas adrenais (**Figura 7**).

Figura 7. Metabolismo da testosterona por enzimas dos citocromos hepáticos P450. Na via de produção da testosterona (T) em glândulas adrenais e gônadas é necessária a atividade de 17-hidroxilação e de 17-20 liase catalisadas pelo citocromo P450c17 (CYP17A1), que por sua vez interage com o POR (P450 óxido-redutase) para receber elétrons. Após produção pelas adrenais e gônadas, na circulação, a maior parte da testosterona está ligada à SHBG, a fração livre da testosterona é a que atua em tecidos periféricos mediada pelo receptor de andrôgenos (AR) ou é transportada até o fígado onde é convertida em compostos esteróides menos ativos. Dentre os metabólitos transformados no fígado, os mais abundantes são: 6β-OH-testosterona e 16β-OH-testosterona. Dentre os citocromos hepáticos que atuam no metabolismo da testosterona destacam-se os codificados pelos genes CYP3A5, CYP3A7, CYP3A4, CYP2C19 e CYP2C9. T, representada pelo símbolo: ●; globulina ligadora de hormônios sexuais, representada pelo símbolo: ★; compostos esteróides menos ativos representados pelo símbolo: ●.

Os citocromos supracitados apresentam grande importância na variabilidade interindividual na resposta terapêutica às drogas. Dados recentes da literatura demonstraram que esta diversidade é geneticamente determinada pela presença de variantes alélicas, as quais podem aumentar ou diminuir a atividade catalítica para uma determinada reação de metabolização (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2001).

1.5.1 Enzimas P450 Relacionadas à Metabolização da Testosterona

1.5.1.1 Citocromo P4503a5

O P4503a5 possui expressão hepática, sendo também muito expresso em tecidos extra-hepáticos, tais como, rins, pulmões, glândulas adrenais, mama, próstata e leucócitos mononucleares. O seu gene está localizado num *cluster* no cromossomo 7, especificamente na região 7q21-q22.1, em cadeia com os demais genes da subfamília CYP3A e alternando com seus respectivos pseudogenes (**Figura 8**) (Gellner *et al.*, 2001; Yamaori *et al.*, 2004).

Figura 8. O *locus* da subfamília CYP3A localizado no cromossomo 7q21-q22.1, contém quatro genes CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43 e três pseudogenes CYP3AP1, CYP3AP2 e CYP3AP3. As flechas indicam o sentido da transcrição. Adaptado de Lamba JK *et al.*, 2002

O polimorfismo mais freqüente e funcionalmente importante do gene CYP3A5 consiste na transição A6986G no intron 3, sendo o alelo carreador desta substituição denominado por CYP3A5*3C. Esta alteração cria um sítio

de *splicing* alternativo, que altera a quadro de leitura e pode envolver inserções de sequências intrônicas e/ou deleções subsequentes de exons. Os RNAm processados anormalmente (RNAm variantes) contêm vários códons de terminação prematura e por isso geram proteínas truncadas. O transcrito mais frequente é o SV1, que gera uma proteína truncada formada por 102 aminoácidos, sem atividade enzimática (Kuehl *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2004) (**Figura 9**). Esta variante é a mais comum em todos os grupos étnicos, sendo encontrada em 5 a 15% dos alelos de caucasianos, 45 a 73% de afro-americanos, 27% de chineses, 30% de coreanos e 27% de mexicanos (Hustert *et al.*, 2001; Quaranta *et al.*, 2006).

Figura 9. RNAm processados na presença do polimorfismo A6986G no gene *CYP3A5*. A alteração A>G no nt 6986 localizado no intron 3 cria um novo sítio de *splicing* alternativo o qual provoca uma alteração no quadro de leitura, podem ocorrer tanto inserções intrônicas (transcritos SV1, SV2) como deleções exônicas (transcrito SV3). Adaptado de Kuehl *et al.*, 2001

Considerando que o P4503a5 catalisa a biotransformação da 6 β -testosterona levando à inativação da testosterona, vários estudos associaram variantes do *CYP3A5* com o câncer de próstata. Os genótipos *CYP3A5**1/*1 e *CYP3A5**1/*3 foram considerados “genótipos protetores” contra este câncer e quando acometidos desenvolvem tumores menos agressivos (Plummer *et al.*, 2003; Zhenhua *et al.*, 2005).

Outro polimorfismo importante do gene *CYP3A5* é o alelo *CYP3A5**6 que causa uma deleção parcial do exon 7 e resulta em uma proteína sem atividade funcional. Esta variante é encontrada em 12% dos alelos de afro-americanos e em caucasianos possui frequência inferior a 1% (Kuehl *et al.*, 2001; Gervasini *et al.*, 2005). Adicionalmente, foram descritos polimorfismos também nas extremidades 5' e 3' deste gene. A análise funcional de um polimorfismo localizado na 3'UTR (*untranslated region*), o alelo *CYP3A5**1D, evidenciou que este acarreta uma instabilidade do RNAm, diminuindo a taxa de expressão da enzima (Xie *et al.*, 2004). Adicionalmente, foi observado que este alelo encontra-se em desequilíbrio de ligação com o *CYP3A5**3C, originando o haplótipo *CYP3A5**3A (Willrich *et al.*, 2008).

1.5.1.2 Citocromo P4503a7

A *CYP3A7* é a isoforma *CYP3A* dominante no fígado fetal e sua expressão decresce rapidamente após o nascimento. O P4503a7 catalisa as reações de 16 α -hidroxilação de DHEA e DHEAS, além da 6 β -hidroxilação da testosterona. Ensaios cinético-enzimáticos entre as isoformas pertencentes à

subfamília *CYP3A*, utilizando a testosterona como substrato padrão, demonstraram que a isoforma *CYP3A7* possui valores de K_m , medida da afinidade da enzima para um determinado substrato, idêntico ao apresentado pela *CYP3A4*. Este fato reforça a hipótese de que uma isoforma substitui a outra em períodos diferentes da vida (Williams *et al.*, 2002).

Recentemente, foi descrita a sua expressão em vários órgãos no adulto, como rins, pâncreas e pulmão (Finta & Zaphiropoulos, 2000), a qual decorre da presença da variante *CYP3A7*1C*. Este alelo possui várias substituições localizadas na região promotora e caracteriza-se por apresentar a sequência do elemento de resposta (ER6) da isoforma *CYP3A4*. Supõe-se que a sequência ER6 do *CYP3A4* possa ter sido transferida para o *CYP3A7* por evento de micro-conversão gênica durante emparelhamento desigual na meiose e que isto possibilitaria a sua expressão na vida pós-natal (Burk *et al.*, 2002; Rodriguez-Antona *et al.*, 2005).

A frequência alélica da variante *CYP3A7*1C* em populações caucasianas e afro-americanas foi aproximadamente de 3-6% (Lamba *et al.*, 2002). Em indivíduos normais, constatou-se que o alelo associava-se a concentrações 47,7% menores de DHEAS (Smit *et al.*, 2005). Similarmente, um outro estudo que avaliou um grupo de mulheres com a síndrome dos ovários policísticos, observou que as portadoras do alelo *CYP3A7*1C*, em heterozigose, apresentavam concentrações de DHEAS significativamente menores ($p=0.0006$), bem como uma tendência de concentrações menores de testosterona total ($p=0.046$) (Goodarzi *et al.*, 2008).

1.5.1.3 Citocromo P4503a4

O *CYP3A4* é o mais prevalente P450 no fígado e intestino delgado, e apresenta papel determinante no metabolismo em mais de 50% das drogas disponíveis comercialmente. Também é expresso em tecidos extra-hepáticos como pulmão, estômago e adrenal. Durante a vida fetal, o *CYP3A4* tem expressão muito reduzida, aumentando logo após o nascimento e alcança sua expressão máxima na vida adulta. A expressão do gene *CYP3A4* é induzida por uma série de compostos, tais como barbitúricos (Pentobarbital, Tiopental e Tiamilal entre outros) e macrolídeos (Azitromicina, Eritromicina, Claritromicina entre outros) (Patki *et al.*, 2003).

Vários estudos apresentam a isoforma *CYP3A4* como a principal responsável pela oxidação de hormônios esteróides. O principal metabólito produzido a partir da hidroxilação da testosterona é o 6 β -testosterona e outros metabólitos em menor proporção tais como, 16 β -, 15 β -, 15 α -, 2 β -testosterona (Williams *et al.*, 2002; Patki *et al.*, 2003). Estudos *in vitro* demonstraram que a capacidade do P4503a4 em metabolizar a testosterona em 6 β -testosterona é até oito vezes maior quando comparado à de outros P450 (Yamazaki *et al.*, 1997).

Alguns polimorfismos foram identificados no *CYP3A4*, porém estes apresentam frequências baixas em diferentes grupos étnicos. Recentemente foi descrita a variante alélica *CYP3A4*18*, a qual foi associada ao fenótipo ultrametabolizador para testosterona. Estudos *in vitro* demonstraram que a capacidade de biotransformação da testosterona pelo alelo *CYP3A4*18* foi

aproximadamente o dobro em relação à do alelo selvagem, sendo a única variante descrita apresentando este fenótipo utilizando a testosterona como substrato (Dai *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2009).

1.5.1.4 Citocromo P450c19

O gene do P450c19 está localizado no braço longo do cromossomo 10, região 10q24, especificamente em um *cluster* de genes pertencentes à família *CYP2C*, contendo: *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C18* e *CYP2C19*, com grande homologia entre suas seqüências de aminoácidos e semelhança estrutural. Todos estes genes apresentam polimorfismos genéticos funcionalmente relevantes, pois conferem diferenças no catabolismo dos substratos dos P450c. A isorforma *CYP2C19* é expressa principalmente no fígado e é uma das principais enzimas responsáveis pela metabolização de fármacos como omeprazol, proguanil, diazepam, imipramina, citalopram e de várias substâncias endógenas, tais como andrógenos e estrógenos (Yamazaki *et al.*, 1997; Desta Z *et al.*, 2001).

A variante genética *CYP2C19*17* consiste em um haplótipo de duas substituições nas posições -806 C>T e -3402 C>T, na região promotora do gene e é conhecida por causar um aumento de 2-4 vezes na taxa de transcrição, sendo associada ao fenótipo ultrametabolizador. Esta alteração na região regulatória aparentemente recruta um fator de transcrição do tipo GATA para a posição -806, evidenciado por análises com EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) (Sim *et al.*, 2006; Lofgren *et al.*, 2008).

As variantes genéticas do *CYP2C19* também foram avaliadas quanto à susceptibilidade ao câncer de mama. Foi observado que o fenótipo ultrametabolizador de carreadores do alelo *CYP2C19*17* refletiu em um aumento do catabolismo dos estrógenos e, portanto, em redução do risco de câncer. Esse efeito protetor foi mais significativo na combinação da ingestão em longo prazo suplementar de estrógenos durante a terapia hormonal (Justenhoven *et al.*, 2009).

1.5.2 Enzimas P450 Relacionadas à Síntese da Testosterona

1.5.2.1 Citocromo P450c17

O gene *CYP17A1* está localizado no cromossomo 10q24.3 e codifica a enzima P450c17, que participa de duas reações seqüenciais (17 α -hidroxilase e 17,20-liase) na biossíntese da testosterona e estrógeno (Miller WL, 1988).

A região 5' não traduzida do gene *CYP17A1* pode conter um polimorfismo (T/C) na posição -34, que cria um segundo sítio de ligação do fator de transcrição Sp1, denominado de alelo A2. Este alelo resulta em um aumento da taxa de transcrição do *CYP17A1* e consequentemente da síntese de testosterona; portanto, indivíduos portadores do alelo A2 possuem risco aumentado para doenças andrógeno-dependentes, tais como o câncer de próstata e SOP (Sharp *et al.*, 2004; Sobti *et al.*, 2009).

O alelo *CYP17A1*A2* foi avaliado em um grupo de mulheres com a síndrome dos ovários policísticos com o intuito de analisar se a

hiperandrogenemia poderia estar sendo modulada por esta variante. O grupo de mulheres que carregava o genótipo A2/A2 apresentava concentrações significativamente maiores de andrógenos em comparação às do grupo com genótipo selvagem, o que poderia corroborar com a etiologia do hiperandrogenismo (Pérez *et al.*, 2008). Similarmente, pacientes com câncer de próstata e carregadores do genótipo A2/A2 apresentaram concentrações significativamente maiores da proteína antígeno prostático específico (PSA) (Guli *et al.*, 2006).

1.5.2.2 Citocromo P450 Óxido-Redutase

O citocromo P450 óxido-redutase (POR) tem a função de intermediar a doação de elétrons do NADPH para todas as enzimas P450 microsossomais do tipo 2. Seu gene contém 16 exons e 15 introns, está localizado no braço longo do cromossomo 7, na posição 7q11.2, e codifica uma proteína de 680 aminoácidos (Miller WL, 2005).

A estrutura protéica do citocromo P450 oxido-redutase possui domínios funcionais bem definidos em nível molecular. O POR apresenta dois domínios distintos aceptores de elétrons do NADPH, o domínio flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e o domínio flavina mononucleotídeo (FMN), e existe uma região que se assemelha a uma haste flexível entre esses dois domínios. Quando o domínio FAD recebe elétrons do NADPH, a haste flexível da proteína modifica sua conformação permitindo o alinhamento entre os dois domínios com a transferência de elétrons do domínio FAD para

o FMN. Subsequentemente, a haste dobra-se novamente permitindo a transferência de elétrons do domínio FMN para a região aceptora de elétrons das enzimas P450 tipo 2 (**Figura 10**). Nesta reação é necessária a participação, do citocromo b5, uma proteína que apresenta efeito alostérico, promovendo a melhor interação entre o POR e algumas das enzimas P450 tipo 2 (Miller WL, 2005).

Figura 10. Representação esquemática da transferência de elétrons mediada pelo POR a partir do NADPH para as enzimas P450 tipo 2. Os elétrons doados pelo NADPH viajam através dos domínios FAD, o POR muda sua estrutura conformacional e transfere os elétrons para o domínio FMN e depois este alcança a região redox do parceiro P450, permitindo sua atividade catalítica. Algumas enzimas necessitam da ação do citocromo b5, como facilitador alostérico. FAD, flavina adenina dinucleotídeo, FMN, flavina mononucleotídeo, NADPH, fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo, POR, P450 óxido-redutase. Adaptado de Miller WL, 2005

O *POR* é um gene muito polimórfico, e foi demonstrado em estudos *in vitro* que suas variantes podem tanto aumentar quanto reduzir a eficiência catalítica das enzimas P450 tipo 2 (Huang *et al.*, 2008).

A variante A503V foi observada em diversos grupos étnicos, sendo encontrada em 26% dos alelos nos caucasianos, 19% dos alelos nos afro-americanos e 36% dos alelos nos asiáticos (Miller *et al.*, 2009). Estudos *in vitro* demonstraram que esta diminui de forma significativa a atividade de 17 α -hidroxilase e de 17,20-liase do P450c17, para 68% e 58%, respectivamente (Huang *et al.*, 2008).

II. JUSTIFICATIVA

Indivíduos com a forma não clássica e portadores de mutações idênticas no gene *CYP21A2* apresentam grande variabilidade na idade de início e na intensidade das manifestações hiperandrogênicas. Para estas situações a literatura sugere que diferenças individuais na sensibilidade dos tecidos aos andrógenos e/ou no seu metabolismo poderiam ser responsáveis. Porém, as possíveis alterações gênicas envolvidas nunca foram avaliadas na forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase.

Considerando que polimorfismos no gene do receptor de andrógenos, 5 alfa-redutase tipo 2 e nos citocromos *CYP3A5*, *CYP3A7*, *CYP3A4*, *CYP2C19*, *POR* e *CYP17A1* estão associados ao fenótipo de diversas doenças andrógeno-dependentes, supomos que estes também poderiam atuar na modulação do fenótipo da forma não clássica. A identificação destes fatores, uma vez que estes genes podem ter sua transcrição modificada por diversas drogas, provavelmente no futuro poderiam contribuir para a otimização da terapêutica da forma não clássica.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Correlacionar a distribuição alélica do microssatélite CAG do gene *AR* e dos polimorfismos nos genes *CYP3A5*, *CYP3A7*, *CYP3A4*, *CYP2C19* e *CYP17A1*, *POR* e *SRD5A2* com a intensidade das manifestações hiperandrogênicas e com o grau de comprometimento enzimático predito pelas mutações no gene *CYP21A2* em pacientes com a forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase.

3.2 Objetivos Específicos

Verificar se há associação do microssatélite CAG do gene *AR* e dos polimorfismos nos genes *POR*, *CYP3A4*, *3A5*, *3A7*, *2C19*, *CYP17A1* e *SRD5A2* com:

- a) a idade de aparecimento dos sintomas,
- b) o score de Ferriman do hirsutismo ao diagnóstico,
- c) a presença de virilização,
- d) as concentrações basais de testosterona,
- e) a ausência (forma críptica) ou presença de sintomas.

IV. CASUÍSTICA

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Processo # 2097).

Selecionamos 122 pacientes com a forma não clássica, os quais estão em seguimento clínico na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da FMUSP. Estes pacientes se apresentaram na infância com pubarca precoce ou na adolescência e/ou idade adulta com irregularidade menstrual, acne, hirsutismo e/ou infertilidade. Dividimos os pacientes em dois grupos, adulto e pediátrico. Consideramos no grupo adulto, os pacientes com 12 anos ou mais e os menores de 12 anos classificamos no grupo pediátrico. Todos pacientes tiveram seu diagnóstico de forma não clássica confirmado através da dosagem da 17-OHP basal ou pós-estímulo com ACTH sintético ≥ 10 ng/mL (New *et al* 1983; Bachega *et al* 2002). As dosagens hormonais nas mulheres adultas foram coletadas na fase folicular do ciclo menstrual e nas portadoras de amenorréia foi também dosada a progesterona basal, a fim de se descartar a fase lútea do ciclo menstrual. Os dados clínicos bem como a idade ao diagnóstico estão descritos nas **Tabelas 1a e 1b, Anexo**.

Após a confirmação do diagnóstico hormonal, foram coletadas amostras de DNA genômico de sangue periférico dos pacientes e de pelo menos um dos pais para o estudo de segregação das mutações. As amostras foram submetidas à análise por *Southern blotting* e/ou MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), PCR alelo-específico e sequenciamento para detecção de grandes rearranjos gênicos e das mutações de ponto no gene *CYP21A2* (Bachega *et al.*, 1998; Billerbeck *et al.*, 2002; Costa-Barbosa *et al.*, 2010). Foram incluídos apenas os pacientes que tiveram o diagnóstico molecular definido, ou seja, mutações identificadas nos dois alelos do gene *CYP21A2* (**Tabela 2, Anexo**).

Os pacientes também foram divididos em dois grupos (C/C e A/C), de acordo com o comprometimento da atividade enzimática predita pelo genótipo *CYP21A2* (Tusie-Luna *et al.*, 1990; Higashi *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992). Grupo C/C (n = 58): indivíduos homozigotos ou heterozigotos compostos para mutações que predizem atividade enzimática residual de 20 a 60%. Este grupo inclui os carreadores das mutações P30L, V281L, P453S e -126 C>T (White & Speiser, 2000; Araujo *et al.*, 2007). O grupo A/C (n= 62): inclui indivíduos heterozigotos compostos, no qual um dos alelos possui mutações do grupo C e o outro alelo mutações que causam grave comprometimento da atividade enzimática, tais como: deleção do *CYP21A2*, grande conversão gênica, I2 splice, IVS2 -2 A>G, Del 8 nt, I172N, Cluster, Ins T, G291S, Q318X, R356W, G424S, R483P e R483*fram*. Adicionalmente, avaliamos separadamente duas pacientes com fenótipo típico de forma não clássica, entretanto, ambas carregavam genótipos que predizem a manifestação

de forma clássica: DNA n°97 (Conversão/IVS2 -2 G>A) e DNA n°1664 (Deleção/Ins T, V281L).

Quarenta e nove pacientes apresentaram hirsutismo, entretanto foi possível determinar o *score* de Ferriman antes de qualquer tratamento em 33 delas. Estas foram divididas em dois grupos de acordo com a intensidade do *score* de Ferriman ao diagnóstico: hirsutismo leve, *score* ≤ 14 (n= 18) e hirsutismo grave, *score* ≥ 15 (n= 15).

V. MÉTODOS

As dosagens hormonais ao diagnóstico (cortisol, androstenediona, testosterona, progesterona e 17-OHP) foram realizadas por radioimunoensaio em duplicata e determinadas no soro. Todas as dosagens foram realizadas no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular – LIM/42, da Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os coeficientes de variação intra e interensaio foram menores do que 18% para todos os ensaios.

5.1 Estudo Molecular

O DNA de leucócitos de sangue periférico foi extraído pelo método *salting out* (Miller *et al.*, 1988).

5.2 Estudo Molecular do Microssatélite CAG do Gene do Receptor de Andrógenos

Para amplificar a região de repetições CAG do exon 1 do AR foi utilizado um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), sendo um deles marcado com corante fluorescente na extremidade 5': GCT GTG AAG GTT GCT GTT CCT C e FAM- GTG CGC GAA GTG ATC CAG AA (Lubahn *et al*, 1988). A reação foi realizada em volume final de 50 μ L, com 1 μ L DNA genômico, 200 μ M de desoxinucleotídeos (dNTP), 15 pmol de cada *primer*, 0,7 U de enzima *Taq DNA polimerase* (Go-Taq, Promega Corporation, EUA), 5X *GoTaq™ Reaction Buffer* contendo 7,5 mM $MgCl_2$, pH 8,5. A amplificação foi realizada no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O programa de amplificação utilizado consistiu de um ciclo de 96°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 96°C por 2 minutos, 54°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e por último a extensão final de um ciclo de 72°C por 30 minutos. Cinco microlitros do produto da PCR e 0,5 μ g do marcador de peso molecular Φ X174/*Hae III* (Invitrogen, Life Technology, Gaithersburg, MD, EUA) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, visualizados em luz ultravioleta e fotografados para confirmar a amplificação do fragmento de interesse.

Dois microlitros do produto resultante da amplificação foram misturados à 24 μ L de formamida HIDI e 1 μ L do padrão de peso molecular ROX-500® (Applied Biosystems). Após desnaturação por 4 minutos a 94°C e repouso no

gelo por 3 minutos, o material foi submetido à eletroforese capilar no seqüenciador automático ABI PRISM Genetic Analyzer 310 Automatic DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e analisado pelo *software* GeneScan (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

5.3 Estudo da Inativação do Cromossomo X

A análise do padrão de inativação do cromossomo X foi realizada com DNA de leucócitos periféricos das pacientes com a forma não clássica, todas heterozigotas quanto ao número de repetições CAG. Este estudo foi feito segundo protocolo modificado de Allen *et al.*, (1992), o qual baseia-se no conceito de que a metilação correlaciona-se fortemente com a inativação do cromossomo X. Previamente à reação de PCR, 2 µg de DNA genômico, de leucócitos, foram digeridos com 20 U da enzima de restrição *Hpa II* (New England Biolabs, Beverly, MA) de acordo com as instruções do fabricante. Esta enzima digere apenas o DNA não metilado (alelo ativo) e, como os *primers* utilizados nas reações de PCR flanqueiam as regiões de repetições e que sofre a metilação, apenas o DNA metilado (alelo inativo) é amplificado. Todas as reações, digeridas e não digeridas dos pacientes, foram acompanhadas de reações com DNA de um homem normal, a fim de se verificar a eficiência da digestão enzimática e de se normalizar as variações interensaio que podem ocorrer do tamanho do fragmento.

Cem nanogramas dos produtos de PCR, com DNA previamente digerido e não digerido, foram submetidos ao mesmo ensaio de eletroforese capilar no seqüenciador automático ABI PRISM Genetic Analyzer 310 Automatic DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e analisados pelo programa de análise de fragmentos GeneScan (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Todas as reações foram analisadas em duplicata.

5.4 Determinação do Desvio de Inativação do Cromossomo X

Nas amplificações de fragmentos de tamanhos diferentes do trato CAG, em função do número de repetições, ocorre uma amplificação preferencial dos alelos de tamanho menor. Este fato se reflete na presença, no eletroferograma, de dois picos com amplitudes diferentes, quando o esperado seriam dois picos com a mesma amplitude, pois os dois alelos ocorrem na mesma proporção.

Quando o DNA é digerido pela enzima *Hpa II*, este fato continua ocorrendo, adicionado à diminuição na amplificação do alelo que foi digerido, o alelo não metilado. Deste modo, foi necessário aplicar um fator de correção para normalizar os níveis de amplificação, como descrito anteriormente por Pegoraro *et al.*, (1997). A área do alelo com número menor de repetições (que é o preferencialmente amplificado) foi dividida pela

área do alelo com número maior de repetições, para se verificar quantas vezes o primeiro foi preferencialmente amplificado. Após a digestão com a *Hpa II*, este fator foi aplicado na área do alelo maior, para normalizar o nível de amplificação entre os dois alelos (**Figura 11, Anexo**)

Após a correção da amplificação, foi determinado o padrão de inativação do cromossomo X. Quando a amplificação de um dos alelos, após a digestão, for $\leq 74\%$ consideramos como padrão randômico e, quando $\geq 75\%$ como desvio de inativação (Gale *et al.*, 1994; Busque *et al.*, 1996; El Kassar *et al.*, 1998; Sharp *et al.*, 2000; Bolduc *et al.*, 2008).

5.5. Pesquisa de Variantes Alélicas nos Genes *CYP3A5*, *CYP3A7*, *CYP3A4*, *CYP2C19* e *CYP17A1*, *POR* e *SRD5A2*

5.5.1 Ensaios de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Para estudo da sequência dos genes *CYP3A5*, *CYP3A7*, *CYP3A4*, *CYP2C19* e *CYP17A1*, *POR* e *SRD5A2* foram utilizados *primers* específicos complementares às regiões flangeadoras exon-intron. Na **Tabela 3** do Anexo estão descritas as sequências de todos os *primers* utilizados nas reações de PCR, sequenciamento e de PCR-RFLP. Os *primers* foram desenhados de modo a cobrir a região codificadora de interesse.

Os ensaios de PCR foram otimizados a partir de um protocolo básico, inicialmente mantiveram-se constantes as concentrações dos componentes da reação e o número de ciclos (35 ciclos) e variou-se a temperatura de hibridação dos *primers*.

Na composição dos reagentes da PCR, foram utilizados: 100-500 ng de DNA genômico, 200 μ M de desoxinucleotídeos (dNTP), 25 pmol de cada *primer*, 0,7 U de enzima *Taq DNA polimerase* (Go-Taq, Promega Corporation, EUA), 5X GoTaq™ *Reaction Buffer* contendo 7,5 mM MgCl₂, pH 8,5, em um volume final de 50 μ L completados com água Milli-Q.

A amplificação foi realizada no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Todas as amplificações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os reagentes exceto o DNA).

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% com TAE 1% em cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA). A separação eletroforética foi realizada por 40 minutos a 85 V e 60 mA, utilizando-se a fonte *Model 250* (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA). Como referência foi utilizado o marcador de peso molecular Φ X174/*Hae III* (Invitrogen, Life Technology, Gaithersburg, MD, EUA). As bandas foram visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 mg/mL) (Invitrogen, Life Technology, Gaithersburg, MD, EUA) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem Ultra Cam Digital Imaging A650 (Ultra Lum, Inc. Claremont, CA, EUA).

5.5.2 Ensaios de Sequenciamento de DNA

Após os ensaios de PCR, para genotipagem dos polimorfismos *CYP3A5*3C*, *CYP3A5*6*, *CYP3A5*1D*, *CYP3A7*1C*, *PORA503V*, realizamos reações de sequenciamento.

Os produtos de PCR foram purificados através de pré-tratamento enzimático com 2 µL das enzimas *Exo SAP IT* (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) para cada 5 µL de produto de PCR e, em seguida, submetidos à reação de sequenciamento utilizando o *Kit ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com *primers* específicos (**Tabela 3, Anexo**).

Para o ensaio de sequenciamento foi utilizado o termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) aplicando-se o seguinte protocolo: 96°C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos, 60 °C por 4 minutos, durante 25 ciclos.

Os produtos foram submetidos à eletroforese capilar em seqüenciador automático de DNA e analisados através do *software* ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e os resultados foram comparados com a respectiva seqüência selvagem depositada no *GeneBank*: *CYP3A5*: Gene ID 1577, Ref.Seq.: AC 005020; *CYP3A7*: Gene ID 1551/ Ref Seq.: AC069294; *POR*: Gene ID 5447, AC005067. Os eletroferogramas podem ser observados nas Figuras 12 a 16.

Figura 12. Eletroferogramas das reações de sequenciamento de amostra de DNA para o rastreamento do alelo *CYP3A5*3C*. Genótipo 1: *1A/*1A (*Wild Type*); Genótipo 2: *1A/3C (Heterozigoto); Genótipo 3: *3C/*3C (Homozigoto Mutante)

Figura 13. Eletroferogramas das reações de sequenciamento de amostra de DNA para o rastreamento do alelo *CYP3A5*6*. Genótipo 1: *1A/*1A (*Wild Type*); Genótipo 2: *1A/6 (Heterozigoto)

Figura 14. Eletroferogramas das reações de sequenciamento de amostra de DNA para o rastreamento do alelo *CYP3A5*1D*. Genótipo 1: *1A/*1A (*Wild Type*); Genótipo 2: *1A/1D (Heterozigoto); Genótipo 3: *1D/1D (Homozigoto Mutante)

Figura 15. Eletroferograma de reação de sequenciamento de amostra de DNA para o rastreamento do alelo *CYP3A7*1C* (contendo as substituições: -188 G>T, -181 T>A, -179 T>C, -178 A>T, -167 T>G, -159 T>A e -129 A>C) em heterozigose

Figura 16. Eletroferogramas das reações de sequenciamento de amostra de DNA para o rastreamento do alelo *PORA503V*. Genótipo 1: POR (*Wild Type*); Genótipo 2: *PORA503V* (Heterozigoto); Genótipo 3: *PORA503V* (Homozigoto Mutante)

5.5.3 Ensaios de PCR-RFLP

Os alelos *SRD5A2 V89L*, *SRD5A2 A49T*, *CYP17A1*A2*, *CYP2C19*17* e *CYP3A4*18* foram identificados através de ensaios de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Os ensaios de digestão enzimática para rastreamento dos alelos V89L e A49T do gene *SRD5A2* foram realizados utilizando-se 3 U das enzimas de restrição *RsaI* (GT//AC) e *MwoI* (GCNNNNN//NNGC) (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA), respectivamente, 10 µL do produto de PCR do exon 1 em banho de água à 37°C, *overnight*, em volume final de reação de 20 µL. Os produtos de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose 3%. Para monitorar o tamanho dos fragmentos gerados pela restrição enzimática foi usado o marcador de peso molecular Φ X174/*Hae III* (Invitrogen, Life Technology, Gaithersburg, MD, EUA).

Na presença do alelo selvagem em homozigose, V89, a digestão enzimática do produto de PCR gera fragmentos com 89 e 35 pb. Na presença do alelo mutante em homozigose, 89L, não ocorre clivagem do produto de PCR e se observa uma única banda com 124 pb (Figura 17). Para o rastreamento do alelo A49T, a digestão enzimática do produto de PCR gera fragmentos com 89 e 33 pb na presença de amostra homozigota selvagem, A49. Na presença do alelo mutado 49T em homozigose não ocorre a clivagem do produto de PCR e se observa único fragmento com 123 pb.

Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo, dos produtos de restrição de PCR com a enzima *Rsa I* para rastreamento do alelo *SRD5A2 V89L*. Linha 1: Marcador de peso molecular Φ X174/*Hae III*, Linhas 2,3,5,6: amostras de indivíduos carregando o alelo *SRD5A2 V89L* em heterozigose, identificação da banda com 89 pb e a banda com 35 pb, visualizada no gel, não pode ser observada na foto. Linha 4: amostra de indivíduo homozigoto para o alelo *SRD5A2 Wild Type*, visualização de uma única banda com 89 pb (a banda esperada com 35 pb não foi visualizada na impressão)

O alelo *CYP2C19*17* foi rastreado utilizando-se a enzima de restrição *MnLI* (CCTC(N)₇//...) (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA) e o protocolo anteriormente citado, exceto a concentração do gel de agarose que foi de 2%. O ensaio de digestão enzimática gerou fragmentos com tamanhos de 610 e 271 pares de bases na presença do alelo selvagem em homozigose. Na presença do alelo *17 não ocorre clivagem e se observa uma banda com 881 pb (**Figura 18**).

Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, da restrição de produto de PCR com a enzima *Mnl I* para rastreamento do alelo *CYP2C19*17*. Linha 1: Marcador de peso molecular Φ X174/*Hae III*, Linhas 2, 4, 6: amostras de indivíduos carreadores do alelo *CYP2C19 Wild Type* em homozigose, visualização das bandas com 610 e 271 pb. Linha 3, 5: amostras de indivíduos carreadores do alelo *CYP2C19*17* em heterozigose, visualização das bandas com 881, 610 e 271 pb

Nos ensaios de restrição enzimática para o rastreamento do alelo A2 do gene *CYP17A1* utilizamos a enzima de restrição *MspAI* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA) e o mesmo protocolo anterior. O padrão de bandas gerado pela clivagem enzimática do produto de PCR gerou fragmentos com tamanhos de 335 e 124 pares de bases na presença do alelo mutado em homozigose. Na presença do alelo selvagem, em homozigose, não ocorre clivagem e se observa uma única banda com 459 pb (**Figura 19**).

O alelo *CYP3A4*18* foi rastreado utilizando-se a enzima de restrição *MspI* (C//CGG) (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA). De

acordo com protocolo previamente publicado, o ensaio de digestão enzimática gerou fragmentos com tamanhos de 285 e 146 pares de bases na presença do alelo mutado em homozigose. Na presença do alelo selvagem, em homozigose, não ocorre clivagem e uma única banda com 431 pb é observada.

Figura 19. Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, da restrição com *MsPA I* de produto de PCR para pesquisa alelo A2 do gene *CYP17A1*. Linha 1: Marcador de peso molecular Φ X174/*Hae III*, Linhas 2,5: amostras de indivíduos carreadores do alelo *CYP17A1 Wild Type* em homozigose, visualização da banda com 459 pb. Linhas 3,4,6: amostras de indivíduos carreadores do alelo *CYP17A1*A2* em heterozigose, visualização das bandas com 459, 335 e 124 pb

5.6 Análise Estatística

Para variáveis contínuas realizamos inicialmente o Teste de Shapiro Wilk a fim de se verificar se a distribuição dos dados era normal. A variável “número de repetições CAG” apresentou distribuição normal e foi representada como média e desvio padrão da média. Foram utilizados os testes paramétricos t de *Student* nas comparações entre dois grupos e o ANOVA nas comparações entre mais de dois grupos.

As variáveis “concentrações de testosterona”, “17-OHP basal e pós-estímulo” e “score” de Ferriman tiveram distribuição não-normal e foram representadas como mediana e intervalo interquartil (Bussab & Morettin, 1987). Para a análise estatística, duas estratégias foram usadas: primeiramente, tentou-se uma transformação logarítmica e observou-se uma distribuição normal, exceto para a variável “idade ao diagnóstico”. Os dados foram comparados usando-se os testes t de *Student* e ANOVA. A variável “idade ao diagnóstico” foi comparada através dos testes não-paramétricos Wilcoxon rank-sum e o Kruskal Wallis rank (Conover WJ, 1980).

Na análise de variáveis categóricas realizamos os testes de associações utilizando-se o teste Qui-quadrado (Kirkwood & Sterne, 2006).

Para a análise multivariada, foi utilizada uma modificação da regressão linear, que leva em consideração diferentes padrões de herança genética: recessiva, dominante ou codominante (Cleves MA, 2005). Basicamente, foi realizada uma regressão linear tradicional, corrigida para co-variáveis de

interesse e, três resultados foram fornecidos: um considerando-se a herança recessiva, um considerando-se a herança dominante e uma média dos dois. Como não sabíamos o padrão de herança de cada gene, usamos a média dos dois modelos de herança. O mesmo algoritmo testa se os alelos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg antes de realizar a regressão linear. Para a regressão linear, incluímos as variáveis hormonais, clínicas, genótipo *CYP21A2*, média de repetições de CAG, além de todos os polimorfismos genéticos testados. Para as análises estatísticas univariadas, considerou-se significativo $p < 0,05$ e intervalo de confiança 95% que não inclui a unidade. Para as análises multivariadas, planejou-se uma correção de Bonferroni para múltiplas comparações, porém, como nenhuma associação atingiu significância estatística, esta correção não foi necessária.

VI. RESULTADOS

6.1 Análise da Casuística de Acordo com a Gravidade do Genótipo da 21-Hidroxilase

No grupo A/C (54 M, 8 H), 30 pacientes pertenciam ao grupo pediátrico, 22 ao grupo adulto. A média de idade ao diagnóstico no primeiro grupo foi de $6 \pm 2,5$ anos e de $29 \pm 11,3$ anos nos adultos. No grupo C/C (52 M, 6 H), 24 pertenciam ao grupo pediátrico, 25 ao grupo adulto, a média de idade ao diagnóstico das crianças foi de $7 \pm 2,3$ anos e de $28 \pm 12,7$ anos nos adultos. Onze pacientes eram assintomáticos e foram diagnósticos durante estudo dos familiares, 5 deles eram do grupo A/C e 6 do grupo C/C. No grupo assintomático a média de idade foi de 23 ± 12 anos. Considerando o número total de pacientes do sexo masculino neste estudo, oito foram diagnosticados na infância por pubarca precoce e seis durante o estudo de segregação das mutações do caso índice nos membros familiares. Em oito pacientes não foi possível identificar a idade exata ao diagnóstico.

Dentre todas as mulheres adultas, 49 apresentaram hirsutismo e a gravidade do hirsutismo diferiu significativamente entre os grupos A/C e C/C, a média do score de Ferriman no grupo A/C foi de $12 \pm 5,1$ e no grupo C/C foi de $17 \pm 6,9$ ($p = 0,04$).

Identificamos uma diferença significativa entre as concentrações basais de 17-OH progesterona entre os grupos A/C média de $21,4 \pm 18,3$ ng/mL e C/C $9,9 \pm 10,7$ ng/mL ($p=0,001$), bem como com os valores de 17OHP pós-estímulo, A/C média de $59,0 \pm 42,3$ ng/mL e C/C média de $39,5 \pm 22,8$ ng/mL ($p=0,009$). Esta influência do genótipo nas concentrações de 17-OHP também se manteve quando as análises foram realizadas de acordo com o sexo ($p=0,05$).

As análises das concentrações basais de andrógenos foram realizadas somente nas adultas, após a exclusão dos valores do sexo masculino e dos pacientes com a forma assintomática. Nos grupos A/C e C/C, a média da testosterona foi de $74,0 \pm 49$ ng/dL e de $64,0 \pm 51,9$ ng/dL, respectivamente ($p>0,05$) e da androstenediona foi de $2,88 \pm 2,3$ ng/mL e de $2,25 \pm 1,5$ ng/mL, respectivamente ($p>0,05$).

As concentrações de testosterona diferiram significativamente entre as mulheres com e sem hirsutismo, ($92,9 \pm 49,5$ ng/dL e $43,8 \pm 38,0$ ng/dL, respectivamente, $p=0,0002$). Entretanto, as concentrações de testosterona não diferiram quando se considerou o número de sintomas ao diagnóstico: assintomáticos ($54,1 \pm 23,9$ ng/dL), hirsutismo com ciclo regular ($82,4 \pm 46,8$ ng/dL) e hirsutismo com irregularidade menstrual ($102,2 \pm 69,9$ ng/dL) ($p>0,05$). Na presença ou ausência de clitoromegalia, as concentrações de testosterona também não variaram significativamente entre as mulheres adultas, $138,6 \pm 73,1$ ng/dL e $94,5 \pm 66,6$ ng/dL, respectivamente ($p>0,05$).

6.2 Determinação da Frequência Alélica das Repetições CAG nas Pacientes com Forma Não Clássica e em Mulheres Normais

O número de repetições CAG contido em cada fragmento analisado pelo GeneScan foi determinado pela equação da reta resultante da análise de regressão de Spearman, padronizada em estudo anterior (Rocha *et al.*, 2008). Os resultados podem ser observados nas tabelas **Tabela 4** e **5 (Anexo)**. A média do nCAG dos pacientes com a forma não clássica foi de $21,4 \pm 2,6$ (variou de 12 a 31) e em 89 controles foi de $21,9 \pm 3,3$ (variou de 10 a 31), **Tabela 5 (Anexo)**, ($p>0,05$). Observamos que 88% das pacientes e 90% das mulheres normais foram heterozigotas para o número de repetições CAG.

Analizamos a distribuição alélica do microssatélite CAG nos pacientes com a forma não clássica e em mulheres normais. Os alelos mais freqüentes nos pacientes com a forma não clássica foram os com 21 (18%), 22 (12%) e 19 (11%) repetições CAG. Nos controles os alelos mais freqüentes foram os com 21 (16%), 23 (12%) e 24 (12%) repetições. Não houve diferença significativa na frequência de alelos curtos (≤ 18 repetições) entre os pacientes com a forma não clássica (16,5%) e a população controle (12%) ($p>0,05$). Também não houve diferença significativa na distribuição alélica do trato CAG entre o grupo de normais e de pacientes com a forma não clássica ($p>0,05$), a qual pode ser observada na **Figura 20 (Anexo)**.

6.3 Distribuição da Frequência Alélica das Repetições CAG nos Pacientes com a Forma Não Clássica Divididos de acordo com o Período de Manifestação do Fenótipo

Os pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com a idade de manifestação do fenótipo: adultos, pacientes ≥ 12 anos ($n = 47$), pediátrico ($n = 54$) e assintomáticos ($n = 11$). Como já mencionamos anteriormente, em oito pacientes não foi possível se obter os dados da idade ao diagnóstico, os quais foram excluídos desta análise. Nos grupos pediátrico, adulto e assintomático a média do nCAG foi de $22,2 \pm 3,1$ (12 – 30), $22,6 \pm 3,5$ (16 – 31) e de $22,4 \pm 3,6$ (14 – 28), respectivamente (**Tabela 5, Anexo**) ($p > 0,05$).

A frequência alélica das repetições CAG também foi avaliada entre os três grupos. A frequência de alelos curtos (≤ 18 repetições) nos grupos adulto, pediátrico e assintomático foi de 14%, 15% e 9%, respectivamente ($p > 0,05$). A frequência dos alelos longos (≥ 26 repetições) foi de 16% no grupo adulto e de 6,6 % no grupo pediátrico e 13% no grupo de indivíduos assintomáticos ($p > 0,05$) (**Tabela 6; Figura 21, Anexo**).

Nos pacientes com o genótipo A/C e fenótipo se manifestando na fase adulta, a frequência de alelos curtos e longos foi de 18% e 15% ($p > 0,05$), e na infância foi de 13% e 10% ($p > 0,05$), respectivamente. Nos pacientes com genótipo C/C e com fenótipo se manifestando na infância, a frequência de alelos curtos e longos foi de 16% e 2% ($p < 0,05$) e no grupo de adultos foi de

9% e 17% ($p>0,05$) (**Tabela 7; Figura 22, Anexo**). Considerando apenas a frequência de alelos longos no grupo C/C, o grupo pediátrico apresentou a frequência de 2% *versus* 17% do grupo adultos ($p=0,01$). A frequência de alelos longos entre os grupos pediátricos com genótipos A/C e C/C foi de 10% e 2%, respectivamente ($p=0,09$) (**Tabela 7; Figura 23, Anexo**). As demais comparações não apresentaram diferenças com significado estatístico.

6.4 Correlação do nCAG do AR e o Fenótipo de Forma Não Clássica

Nas pacientes heterozigotas para o número de repetições CAG, realizamos o estudo do padrão de inativação do cromossomo X, a fim de se determinar qual dos alelos apresentava expressão preferencial.

O desvio de inativação do cromossomo X ocorreu em 13% das pacientes heterozigotas e em 22% dos controles (**Tabela 9, Anexo**). Nos grupos pediátrico e adulto, o desvio de inativação ocorreu em 23% e 10%, respectivamente. A inativação envolveu preferencialmente o alelo com número maior de repetições em 72% dos casos.

Calculamos a média ponderada, a qual considera o número de repetições CAG e o padrão de ativação do cromossomo X. No grupo A/C, a média ponderada do nCAG dos grupos pediátrico e adulto foram de

21,3 $\pm$ 2,7 e 20,8 $\pm$ 2,7, respectivamente ($p>0,05$). No grupo C/C, a média ponderada do nCAG dos grupos pediátrico e adulto foram de 21,2 $\pm$ 2,4 e 22,1 $\pm$ 2,7, respectivamente ($p>0,05$). Similarmente, não identificamos diferenças na média ponderada do nCAG quando consideramos o período de manifestação e os genótipos (pediátrico A/C x C/C, $p>0,05$; adulto A/C x C/C, $p=0,07$) (**Tabela 8, Anexo**).

Analizamos a média ponderada do CAG, considerando a presença ou ausência de sintomas e também o número de sintomas ao diagnóstico. No grupo de pacientes com um sintoma a média foi de 21,2 $\pm$ 2,9, com dois sintomas a média do nCAG foi de 21,6 $\pm$ 2,8, e no grupo de assintomáticos a média foi de 21,8 $\pm$ 2,05 ($p>0,05$).

Não observamos correlação entre a média ponderada do nCAG e a presença ou ausência do hirsutismo, bem como com o score de Ferriman. No grupo de pacientes hirsutas a média do nCAG foi de 20,9 $\pm$ 2,5 e nas pacientes que não apresentaram hirsutismo foi de 21,7 $\pm$ 2,8. No grupo em que o hirsutismo foi mais grave (score de Ferriman ≥ 15) a média do nCAG foi de 21,5 $\pm$ 3,0 e no grupo em que o hirsutismo foi mais leve (score de Ferriman ≤ 15) a média do n CAG foi de 19,9 $\pm$ 2,3 ($p>0,05$).

Avaliamos também a influência do nCAG do AR na presença de virilização. No grupo de pacientes com clitoromegalia, a média ponderada do nCAG foi significativamente menor, 19,1 $\pm$ 2,7, em comparação à do grupo que não apresentou, que foi de 21,6 $\pm$ 2,5 ($p = 0,007$) (**Figura 24**). Dentre as dez pacientes que apresentaram clitoromegalia, oito delas carregavam alelos com número menor do que 18 repetições.

Figura 24. Média ponderada do nCAG do AR entre pacientes com a forma não clássica com e sem clitoromegalia

6.5 Frequência Alélica dos Polimorfismos dos Genes *CYP3A5*, *CYP3A7*, *CYP3A4*, *CYP2C19* e *CYP17A1*, *POR* e *SRD5A2*

A análise da frequência relativa dos alelos *CYP3A5**3C, *CYP3A5**6, *CYP3A5**1D, *CYP3A7**1C, *CYP3A4**18, *CYP2C19**17, *CYP17A1**A2, *PORA503V*, *SRD5A2* V89L e *SRD5A2* A49T podem ser observadas na **Tabela 10 (Anexo)**. Todos os SNPs estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto os alelos *CYP3A5**6 e *SRD5A2* A49T e *CYP3A7**1C.

Em nossa população o alelo *CYP3A5**3C, um dos mais freqüentes entre os alelos estudados, esteve presente em 80% dos alelos, foi mais freqüente inclusive que o alelo selvagem. O alelo *CYP3A5**1D foi

identificado em 81% dos alelos. Os alelos CYP3A5*3C e CYP3A5*1D também apresentaram desequilíbrio de ligação em nossos pacientes e juntos formam o haplótipo CYP3A5*3A. Em nossa amostra o alelo CYP3A5*6 foi presente em 4%.

Os alelos CYP3A7*1C e CYP3A4*18 mostraram-se poucos freqüentes. A variante CYP3A7*1C foi identificada em 3% dos alelos e nenhum indivíduo com o genótipo 1C/1C foi observado. A variante CYP3A4*18, ultrametabolizadora para testosterona não foi encontrada em nenhum dos nossos pacientes.

A variante ultrametabolizadora CYP2C19*17 foi identificada em 14% dos alelos, sendo que apenas cinco pacientes eram homozigotos. As variantes dos genes CYP17A1 e POR apresentaram frequência elevada em nossa amostra. O alelo CYP17A1*A2 esteve presente em 39% dos alelos, e ainda observamos a frequência de 40% para o genótipo wild type A1/A1, 40% para o genótipo heterozigoto A1/A2 e 19% para o homozigoto mutante A2/A2. Encontramos a variante POR A503V em 25% dos alelos, o genótipo wild type A/A foi identificado em 55,4% dos pacientes, heterozigoto A/V em 37,7% e o homozigoto mutante VV em 6,9% dos pacientes.

A variante V89L do gene SRD5A2 também se mostrou freqüente em nossos pacientes, esteve presente em 31% dos alelos estudados com frequência genotípica de 45% para heterozigotos e de 9% para homozigotos mutantes. Ao contrário da V89L, a variante A49T foi muito pouco freqüente, apenas dois pacientes carregavam o alelo em heterozigose, correspondendo a aproximadamente 1% dos alelos.

6.6 Associação das Variantes Alélicas dos Genes *CYP3A5*, *CYP3A7*, *CYP3A4*, *CYP2C19* e *CYP17A1*, *POR* e *SRD5A2* com o Fenótipo da Forma Não Clássica

Para a análise da metabolização da testosterona, selecionamos somente mulheres adultas e sintomáticas e as subdividimos entre os grupos genotípicos A/C e C/C. Na análise individual de cada polimorfismo, curiosamente as carreadoras da variante *CYP3A5*1D* do grupo A/C exibiram menores concentrações de testosterona em comparação com as pacientes carreando o alelo selvagem ($p=0,04$). Por outro lado, pacientes carreadores da variante *CYP17A1*A2* do grupo genótipo A/C exibiram maiores concentrações de testosterona em relação às portadoras do alelo selvagem em homozigose ($p=0,04$). Como podemos observar na **Tabela 11 (Anexo)**, a presença das demais variantes alélicas não influenciaram as concentrações da testosterona.

Semelhantemente, também não observamos nenhum efeito dos polimorfismos sob o período de manifestação dos sintomas, quando comparamos a idade ao diagnóstico ($p>0,05$) (**Tabela 12, Anexo**). A intensidade do hiperandrogenismo também foi avaliada através da comparação do score de Ferriman do hirsutismo das pacientes. De acordo com a **Tabela 13 (Anexo)** observamos que o score de Ferriman não diferiu significativamente entre os diversos genótipos, mutante e selvagem ($p>0,05$).

Estudamos o papel modulador dos polimorfismos na ocorrência dos sintomas de hiperandrogenismo. A incidência isolada do hirsutismo, clitoromegalia, pubarca precoce e irregularidade menstrual não se associaram à presença de nenhuma das variantes alélicas ($p>0,05$) (**Tabela 14, Anexo**).

Realizamos uma análise multigênica contemplando todas as variantes alélicas e as variáveis clínicas: idade ao diagnóstico, score de Ferriman, concentrações de testosterona, presença de hirsutismo, clitoromegalia, pubarca precoce e a soma de sintomas (hirsutismo isolado e hirsutismo associado à irregularidade menstrual). Nesta comparação observamos correlação significativa entre o alelo *CYP2C19*17*, alelo ultrametabolizador de andrógenos, a um número maior de sintomas, sendo mais associado a indivíduos que apresentavam dois sintomas do que com indivíduos que apresentavam um sintoma. (**Tabela 14, Anexo**) ($p=0,03$).

Além das pacientes com genótipo molecular de forma não clássica, adicionamos ao estudo duas pacientes com genótipo compatível de forma clássica, mas fenotipicamente manifestando a forma não clássica. Em ambas pacientes notamos a presença em heterozigose de alelos pobre metabolizadores: *CYP3A5*3A* e *SRD5A2 V89L*, entretanto nenhuma delas apresentou alelos ultrametabolizadores e/ou que diminuem a síntese de testosterona, tais como: *CYP2C19*17*, *CYP3A7*1C*, *PORA503V*. Com relação ao genótipo CAG, somente uma delas (DNA N° 97) que apresentava clitoromegalia, carregava um alelo curto de repetições CAG (genótipo 18/19).

6.7 Análise de Grupos Familiares

Nesta coorte de pacientes observamos oito grupos familiares com mais de um afetado em uma mesma irmandade, os mesmos estão descritos na **Tabela 15 (Anexo)**.

O primeiro grupo é formado por dois irmãos, a paciente feminina (DNA 366) foi diagnosticada durante a infância com pubarca precoce e na vida adulta desenvolveu irregularidade menstrual apesar da continuidade do tratamento e da obtenção de bom controle hormonal. O irmão (DNA 581) não desenvolveu sintoma (assintomático), tendo sido diagnosticado pela análise molecular. Ambos os pacientes apresentaram os mesmos genótipos para os genes metabolizadores. Entretanto, eles diferiram no nCAG do *AR*, na paciente com pubarca precoce foi identificado um alelo curto de repetições CAG (17 repetições), enquanto que no irmão assintomático um alelo com 22 repetições.

O grupo 2 é composto por três irmãs, todas diagnosticadas na fase adulta devido à presença de hirsutismo. Ao diagnóstico foi observado hirsutismo leve, Ferriman 14, na paciente de DNA 1870 e hirsutismo grave nas pacientes de DNA 1941 e 1734 com Ferriman 30 e 18, respectivamente. As três pacientes carregavam alelos pobre metabolizadores do gene *CYP3A5*. As pacientes com hirsutismo grave foram portadoras da variante *SRD5A2* V89L em homozigose e a paciente com hirsutismo leve apresentou as variantes *SRD5A2* V89L e *CYP17A1**A2, ambas em heterozigose. Com relação ao genótipo do nCAG do *AR*, a paciente com Ferriman 14

apresentou os alelos 21/22, a paciente com Ferriman 18 os alelos 21/24 e a com Ferriman 30, os alelos 21/22.

O grupo 3 é formado por dois irmãos, ambos diagnosticados com pubarca precoce, a paciente feminina (DNA 2072) foi diagnosticada aos 6 anos de idade e quando adulta, apesar do tratamento, apresentou irregularidade menstrual. O irmão (DNA 2116) foi diagnosticado com pubarca precoce aos 3 anos. Ambos são portadores dos alelos pobre metabolizadores *CYP3A5*3* e **1D*, em homozigose, e do alelo ultrametabolizador *CYP17A1*A2* em heterozigose. A variante ultrametabolizadora *CYP3A7*1C* e o alelo *PORA503V* que diminui a síntese de testosterona foram identificados somente no paciente masculino. A paciente feminina foi portadora dos alelos 21/23 do nCAG do *AR*, enquanto que o irmão era portador do alelo com 23 repetições.

O grupo 4 é formado por dois irmãos, o paciente de DNA 3949 foi diagnosticado aos 6 anos com pubarca precoce, enquanto o irmão, DNA 3952, não desenvolveu sintomas, tendo sido diagnosticado pela análise molecular. O paciente assintomático é portador de alelo longo do nCAG do *AR* (28 repetições) e o irmão sintomático, portador de alelo curto (18 repetições). Os alelos pobre metabolizadores, *CYP3A5*3* e *1D*, foram identificados em homozigose em ambos os irmãos; entretanto, o alelo ultrametabolizador *CYP2C19*17* esteve presente apenas no irmão assintomático em heterozigose. O irmão com pubarca precoce é heterozigoto para a variante *SRD5A2 V89L* e o irmão assintomático portador do alelo selvagem.

O grupo 5 possui dois irmãos diagnosticados devido ao aparecimento de pubarca precoce. Ambos são portadores do alelo *CYP17A1*A2* e o

SRD5A2 V89L em heterozigose. A paciente feminina (DNA 5034) apresentou os alelos *CYP3A5*3* e *CYP3A5*1D* em homozigose e o genótipo 20/23 do nCAG do *AR*; enquanto que o irmão (DNA 5192) apresentou os alelos *CYP3A5*3* e *CYP3A5*1D* em heterozigose e homozigose para 23 repetições do nCAG do *AR*.

No grupo 6 formado por dois irmãos, a paciente feminina (DNA 5386) foi diagnosticada na infância com pubarca precoce, quadro que evoluiu na fase adulta para hirsutismo leve associado à irregularidade menstrual e acne pós-puberal a despeito da continuidade do tratamento. A paciente é portadora do genótipo 22/23 do nCAG do *AR*, homozigota para as variantes *SRD5A2 V89L* e *PORA503V* e heterozigota para as variantes *CYP3A5*3* e *CYP3A5*1D*. Seu irmão (DNA 5456) é assintomático e foi identificado pela análise molecular, é carreador do alelo com 22 repetições do nCAG do *AR* e heterozigoto para os alelos *SRD5A2 V89L*, *PORA503V* e *CYP3A5*3* e homozigoto para o alelo *CYP3A5*1D*. Dentre as variantes que aumentam a síntese de testosterona, somente a paciente foi heterozigota para a variante *CYP17A1*A2*.

O grupo 7 possui dois irmãos diagnosticados com pubarca precoce. A irmã (DNA 23) é portadora do genótipo 22/23 do nCAG do *AR* e o irmão (DNA 24) homozigoto para 22 repetições. Ambos carreavam o alelo ultrametabolizador *CYP17A1*A2* e o alelo pobre metabolizador *PORA503V*. Os alelos *CYP3A5*3*, *CYP3A5*1D* e *CYP2C19*17* foram identificados somente no paciente masculino.

O grupo 8 é constituído por dois irmãos diagnosticados com pubarca precoce, a paciente feminina (DNA 88) desenvolveu ainda um quadro de virilização, com clitoromegalia prader 1. Ambos carregavam os alelos *PORA503V* e *CYP3A5*3* e *CYP3A5*1D* em homozigose. A paciente é ainda homozigota para o alelo *CYP17A1*A2* e portadora do genótipo 19/24 do nCAG do AR. Seu irmão (DNA 87) é portador dos alelos *CYP3A5*3*, *CYP3A5*1D* e *SRD5A2 V89L*, em heterozigose e homozigose para o alelo *PORA503V* e o trato CAG com 23 repetições do AR.

VII. DISCUSSÃO

Embora a deficiência da 21-hidroxilase seja uma doença de etiologia monogênica, observa-se um amplo espectro de manifestações clínicas, variando desde virilização pré-natal da genitália externa de fetos femininos até manifestações hiperandrogênicas de início tardio, quadro que caracteriza a forma não clássica (Speiser *et al.*, 2000; Saroj *et al.*, 2009).

Diferentes estudos populacionais na literatura identificaram uma forte correlação na comparação entre o genótipo e a forma clínica (Hughes *et al.*, 2002; Bachega *et al.*, 2004; Dolzan *et al.*, 2005; Finkelstein *et al.*, 2010). Na forma não clássica existem basicamente dois grupos de genótipos A/C e C/C, sendo que o primeiro prediz maior comprometimento da atividade enzimática residual da 21-OH. Entretanto, ambos os grupos possuem em comum pelo menos um alelo C, que prediz moderado comprometimento da atividade enzimática. Consequentemente, pode-se prever o fenótipo de forma não clássica sempre que o indivíduo carrear uma mutação do grupo C no alelo com menor comprometimento enzimático de seu genótipo. Embora haja esta correlação em nossa casuística, bem como em outros estudos populacionais observamos que as concentrações basais e pós-estímulo de 17-OHP são comumente maiores nos pacientes com genótipo A/C em relação aos com genótipo C/C. Este dado evidencia uma modulação do alelo com maior comprometimento enzimático (A), no fenótipo hormonal de forma não clássica.

Entretanto, quando se analisa a expressão clínica entre os dois grupos genotípicos notamos uma ampla variabilidade, inclusive a de indivíduos assintomáticos, onde a presença de um alelo A não necessariamente representa um fenótipo hiperandrogênico clinicamente mais intenso (Bachega *et al.*, 2000; Speiser *et al.*, 2000; Deneux *et al.*, 2001; Bidet *et al.*, 2009).

Semelhantemente às concentrações de 17-hidroxi-progesterona, Bidet *et al.*, (2009) observaram concentrações basais maiores da testosterona e androstenediona no grupo A/C em comparação ao grupo C/C. Em nossa casuística, tanto as concentrações basais de testosterona como de androstenediona não diferiram significativamente entre os dois grupos genotípicos, dado igualmente observado por Deneux *et al.*, (2001) em casuística de 53 mulheres com forma não clássica. O que nos leva a supor o envolvimento de outros genes, relacionados à síntese e/ou metabolismo da testosterona.

Weintrob *et al.*, (2000) reportaram influência do alelo mais grave (A) do genótipo de 45 pacientes com forma não clássica na idade de início dos sintomas, além de maior prevalência de pubarca precoce em relação ao grupo C/C. Em nosso estudo, com casuística de tamanho significativo, não observamos diferenças na média de idade ao diagnóstico e/ou na proporção de pacientes apresentando pubarca precoce em relação as com hirsutismo entre os grupos genotípicos A/C e C/C. Estes achados refletem os dados encontrados nas casuísticas francesa e espanhola, em amostras com 124 e 86 pacientes, respectivamente (Ezquieta *et al.*, 2002; Bidet *et al.*, 2009).

Em nossas pacientes, o hirsutismo foi a manifestação clínica mais frequente, sua prevalência não diferiu entre os dois grupos genótipos, assim como para as demais manifestações, igualmente relatadas pelas autoras Deneux *et al.*, (2001) e Bidet *et al.*, (2009). Porém, diferentemente do esperado, ao compararmos a média do *score* de Ferriman, notamos que o hirsutismo foi mais importante no grupo de mulheres carregando genótipo com maior atividade residual da 21-OH, grupo C/C. Entretanto, analisamos a intensidade do hirsutismo apenas nas mulheres que iniciaram o acompanhamento em nosso serviço sem terem recebido anteriormente qualquer medicação, logo, não podemos afastar que este resultado possa ter sido decorrente do tamanho da amostra. A identificação deste dado nos levou a analisar se estas pacientes, do grupo C/C com hirsutismo mais importante, apresentavam concentrações basais mais elevadas de testosterona do que as demais do mesmo grupo, porém não identificamos diferenças significativas.

Além disso, observamos que no grupo de mulheres hirsutas, portadoras de ambos genótipos (A/C e C/C), a média das concentrações de testosterona foi significativamente maior em comparação às mulheres que não apresentaram esta manifestação. Interessantemente, o mesmo não foi observado quando realizamos esta comparação considerando a presença ou ausência de irregularidade menstrual e/ou de clitoromegalia. Adicionalmente, a presença de clitoromegalia não diferiu de forma significativa entre os grupos genotípicos A/C e C/C. Estes achados demonstraram a complexidade das manifestações hiperandrogênicas, que tanto podem depender das concentrações de andrógenos, tal como ocorreu no hirsutismo, como podem

ter influências de outros fatores, tais como sensibilidade periférica aos andrógenos, como ocorreu com a presença de clitoromegalia.

Nossa hipótese é a de que a variabilidade fenotípica do hiperandrogenismo da forma não clássica aparentemente independa da gravidade do genótipo *CYP21A2* e possa decorrer principalmente de variáveis genéticas relacionadas à ação androgênica e/ou às diferenças na metabolização de andrógenos.

Em estudo prévio, observamos que na forma clássica da 21-hidroxilase variações interindividuais na sensibilidade periférica aos andrógenos, mediada pelo receptor de andrógenos, explica parte da diversidade do fenótipo hiperandrogênico, o que nos levou a avaliá-los na forma não clássica (Rocha *et al.*, 2008). Não podemos afastar também, que diferenças interindividuais no *clearance* da testosterona, possam também interagir no fenótipo da forma não clássica, como já foi descrito em outras doenças andrógeno-dependentes, tais como na SOP e no câncer de próstata (Goordazi *et al.*, 2006; 2008; Nam *et al.*, 2001).

Nesta linha de raciocínio, o trato polimórfico CAG do receptor de andrógenos, que modula a atividade de transativação do receptor, poderia estar envolvido nesta modulação fenotípica. Este trato tem sido associado a outras doenças hiperandrogênicas no sexo feminino. Em mulheres com SOP foi observada uma frequência maior de alelos CAG curtos em comparação à do grupo normal (Shah *et al.*, 2008; Xita *et al.*, 2008). Embora, sob o nosso ponto de vista, pensamos que ambos os estudos

consideraram como alelos CAG curtos um número de repetições relativamente alto ≤ 20 e ≤ 22 , respectivamente.

Em nosso estudo, como era de se esperar, a distribuição alélica do trato CAG não diferiu entre os pacientes com forma não clássica e as mulheres normais, dados concordantes com os de outros estudos prévios, onde não foram observadas diferenças significativas entre as afetadas por SOP e o grupo de normais (Ferk *et al.*, 2008; Jaaskelainen *et al.*, 2005; Mifsud *et al.*, 2000).

Tem sido observada uma influência do trato CAG na gravidade do fenótipo de doenças hiperandrogênicas, tais como uma correlação significativa entre alelos curtos e idade mais precoce ao diagnóstico do câncer de próstata (Mishra *et al.*, 2005; Shimbo *et al.*, 2005). Em nossa casuística, a média ponderada do nCAG, que reflete tanto o número de repetições como a porcentagem de atividade de cada alelo, não diferiu entre as pacientes do grupo pediátrico e as do grupo adulto. Esta média também não diferiu quando levamos em conta a gravidade do genótipo da 21-hidroxilase, tendo sido semelhante na comparação dos grupos pediátricos (A/C x C/C) e na comparação dos grupos adultos (A/C x C/C). Entretanto, com relação à distribuição alélica do trato CAG, identificamos uma frequência significativamente maior de tratos longos no grupo de adulto em relação ao pediátrico com o genótipo C/C. Esta frequência maior de alelos com menor atividade do *AR* pode ter contribuído para o início mais tardio dos sintomas em pacientes com genótipos semelhantes.

Ibáñez *et al.*, (2003) em análise de casuística composta por 181 mulheres observaram que alelos curtos (≤ 20 repetições) do *AR* estiveram associados ao risco aumentado para pubarca precoce e posterior desenvolvimento de hiperandrogenismo ovariano, enquanto que Hickey *et al.*, (2002) identificaram que alelos curtos (≤ 22 repetições) estiveram associados à infertilidade em amostra de 122 pacientes com SOP. Contrariamente, nossos estudos de associação não revelaram influência do nCAG tanto na presença como na ausência das manifestações hiperandrogênicas, bem como na prevalência de pubarca precoce, hirsutismo e de irregularidade menstrual. Também não identificamos associação deste trato como número de manifestações ao diagnóstico, como por exemplo hirsutismo isolado e/ou associado à irregularidade menstrual. Entretanto, gostaríamos de ressaltar que o nosso critério para classificar alelos curtos (≤ 18 repetições) foi mais estrito do que o utilizado nos trabalhos acima citados.

Na avaliação da intensidade do hiperandrogenismo, tomamos em conta os seguintes marcadores: o score de Ferriman do hirsutismo e a presença de clitoromegalia, sinal este que denota um fenótipo mais intenso de hiperandrogenismo, o de virilização. As análises de associação não revelaram influência da média ponderada do nCAG na gravidade do hirsutismo, similarmente aos estudos de Dasgupta *et al.*, (2010) que avaliaram o *locus* CAG do *AR* e a intensidade do hirsutismo em SOP. Entretanto, lembramos que nosso número de pacientes hirsutas que iniciaram o acompanhamento em nosso serviço sem nunca terem antes realizado tratamento foi pequeno. Nossos resultados nos levam a hipotetizar

que pequenas variações do trato CAG, podem não ser significativas, por si só, na modulação do hirsutismo.

Em pacientes com clitoromegalia as concentrações basais de andrógenos não foram diferentes daquelas que não apresentaram esta manifestação, porém notamos uma correlação positiva entre alelos curtos (≤ 18 repetições) e de menor média ponderada do trato CAG com a presença de clitoromegalia. Este dado reforça os observados em estudo anterior realizado em nosso laboratório com pacientes de forma clássica, no qual encontramos uma influência do trato CAG na variabilidade fenotípica da virilização da genitália externa feminina (Rocha *et al.*, 2008). Em homens, também encontramos relatos da influência do trato CAG sob o fenótipo da genitália externa masculina, Ogata *et al.*, (2001) descreveram um paciente 46,XY com ambigüidade genital carregando um alelo raro com 44 repetições CAG, sem nenhuma outra alteração nas regiões exônicas/intrônicas do gene do AR e nem na síntese de testosterona. Os autores concluíram que o trato CAG longo poderia ter exercido um papel modulador no fenótipo do paciente.

Também merece atenção o processo de regulação gênica do receptor de andrógenos, que é extremamente complexo e difere nos diversos tecidos pela atividade de dezenas de proteínas co-reguladoras de expressão. Estas proteínas podem também exercer um papel modulador na sensibilidade periférica aos andrógenos mediada pelo receptor e, conseqüentemente, na variabilidade fenotípica da forma não clássica que poderia ser tecido específico (Bebermeier *et al.*, 2006).

Uma proteína de importância na ação periférica dos andrógenos é a enzima 5 alfa-redutase. A ação periférica da testosterona é potencializada pela atividade desta enzima, que converte testosterona em dihidrotestosterona, um andrógeno mais potente do que a testosterona, sendo em grande parte responsável pelo crescimento e estimulação do folículo piloso. A atividade periférica aumentada da 5 alfa-redutase foi considerada um fator predisponente para o desenvolvimento do hirsutismo idiopático e da pubarca precoce idiopática (Zouboulis *et al.*, 2004).

Variantes alélicas no gene codificador da 5 alfa-redutase tipo 2 tem sido associadas ao desenvolvimento de outras doenças andrógeno-dependentes, tais como câncer de próstata e SOP. Goodarzi *et al.*, (2006) avaliaram uma casuística de 187 mulheres com SOP e concluíram que o alelo 89L, conhecido por reduzir a atividade da 5 alfa-redutase tipo 2, estava associado à menor probabilidade para o desenvolvimento de SOP. Entretanto, esta variante não se correlacionou com uma menor intensidade de hirsutismo. Dentre as variantes que alteram a atividade da 5 alfa-redutase tipo 2, a 89L foi identificada em aproximadamente em 31% dos alelos em nossos pacientes, dado semelhante aos da população normal brasileira (Ribeiro *et al.*, 2002). Diferentemente, nossos estudos de associação não identificaram uma modulação do alelo 89L no fenótipo hiperandrogênico. Este alelo não foi protetor para o desenvolvimento de pubarca precoce na forma não clássica, bem como sua frequência não diferiu de forma significativa entre as nossas pacientes hirsutas com (30%) e sem (35%) irregularidade menstrual.

As pacientes carreadoras da variante 89L apresentaram mediana menor do *score* do hirsutismo e idade de início das manifestações mais tardia em relação às carreadoras do alelo selvagem, porém as diferenças não foram significativas. Esperávamos que portadoras do 89L não manifestassem clitoromegalia; entretanto, identificamos o alelo em 63% destas pacientes, sendo que uma delas era portadora da variante em homozigose. Embora esta variante diminua a atividade da 5 alfa-redutase para 30% *in vitro*, é possível que este comprometimento não seja significativo *in vivo* no fenótipo da forma não clássica (Nam *et al.*, 2001). Provavelmente, na intensidade do hirsutismo, a ação da enzima 5 alfa-redutase tipo 1 seja muito mais importante do que a do tipo 2, como já foi relatado por Goordazi *et al.*, (2006) em pacientes com SOP.

Outro grupo de genes que podem estar envolvidos com a variabilidade de fenótipo na forma não clássica são os dos citocromos P450, envolvidos na síntese e/ou metabolismo dos andrógenos. O citocromo P450c17 desempenha importante papel durante o processo de síntese da testosterona, atuando em uma das etapas limitantes da produção de esteróides. Os citocromos hepáticos P450 codificam as principais enzimas metabolizadoras de fármacos e compostos endógenos, incluindo a testosterona, e são amplamente conhecidos em estudos de farmacogenética. Os principais citocromos responsáveis pelo *clearance* da testosterona são o P4503a5, P4503a4, P4503a7 e P4502c19.

A regulação da atividade de todos os citocromos P450 tipo 2 é dependente da doação de elétrons a partir do NADPH, que é mediada pelo

P450 óxido-redutase (POR). São conhecidas variantes alélicas para todos os citocromos P450 supra mencionados, inclusive para o POR, as quais alteram a atividade catalítica de suas reações, conferindo fenótipos ultra ou pobre metabolizadores (Lamba *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2008).

Uma vez que a frequência de variantes alélicas nos citocromos P450 pode variar de acordo com o grupo étnico, avaliamos estas frequências em nossa amostra. Observamos que a frequência alélica dos alelos pobre metabolizadores (*CYP3A5*3C*, *CYP3A5*1D*, *CYP3A5*6*, *SRD5A2V89L*, *PORA503V*) e ultrametabolizadores (*CYP2C19*17*, *CYP17A1*A2*, *CYP3A7*1C*) são semelhantes às de outros grupos populacionais (**Tabela 9**). Similarmente, assim como já descrito em outras populações, 98% dos alelos *CYP3A5*3C* também carregavam o alelo **1D*, estando portanto em desequilíbrio de ligação (Willrich *et al.*, 2008). Observa-se uma frequência maior do alelo *CYP3A5*1D* em afro-americanos (60% dos alelos) e menor em caucasianos (8%). A frequência relativamente alta do alelo **1D* na nossa casuística provavelmente reflete a miscigenação da nossa população com afrodescendentes (Penna DJS, 2002). Interessantemente, o alelo *CYP3A5*6*, também frequente em africanos (Kuehl *et al.*, 2001; Gervasini *et al.*, 2005), foi relativamente raro em nossos pacientes.

No estudo de associação destas variantes com a idade de aparecimento das manifestações e o genótipo da 21-hidroxilase, notamos associação significativa em pacientes do grupo C/C carregando o alelo *CYP17A1*A2* e idade mais tardia ao diagnóstico. Contudo, uma vez que este polimorfismo aumenta a síntese de testosterona, esperávamos que estas

pacientes fossem diagnosticadas mais precocemente, já que este alelo associa-se à maior produção de testosterona. Porém, conforme havíamos hipotetizado, notamos que portadores do alelo *CYP3A5*6*, que diminui o metabolismo da testosterona, apresentaram idade ao diagnóstico mais precoce em comparação aos carreadores de alelo selvagem com genótipo A/C. Os portadores do alelo *CYP3A7*1C*, que aumenta o metabolismo da testosterona, apresentaram idade ao diagnóstico mais tardio em comparação aos carreadores do alelo selvagem com genótipo A/C. Porém, estas diferenças apesar de interessantes não apresentaram significado estatístico. Considerando a baixa frequência de ambos os alelos em nossa casuística, somente a análise de uma amostra maior poderá definir se estas possuem um efeito modulador na idade de início dos sintomas.

Na análise da intensidade do hirsutismo, indivíduos carregando das variantes ultrametabolizadoras não apresentaram medianas menores do *score* de Ferriman, com exceção para *CYP3A7*1C* no grupo C/C, a qual apresentou *score* de Ferriman menor em relação ao grupo selvagem, mas sem significado estatístico. Indivíduos carreadores de variantes pobre metabolizadoras também não apresentaram medianas maiores do *score* de Ferriman do hirsutismo.

A presença de clitoromegalia não se correlacionou com nenhuma das variantes dos genes metabolizadores, e também não houve correlação destas variantes com a presença de hirsutismo isolado ou associado à irregularidade menstrual, bem como no número de sintomas hiperandrogênicos ao diagnóstico.

Polimorfismos em genes envolvidos na via de síntese ou metabolismo de esteróides sexuais têm sido associados às concentrações da testosterona e à etiologia de doenças com excesso de andrógenos (Perez *et al.*, 2008; Deligeoroglou *et al.*, 2009; Pusalkar *et al.*, 2009; Fernandez *et al.*, 2010). Em nosso estudo, as concentrações de testosterona basal foram significativamente maiores nos indivíduos carreadores do alelo *CYP17A1**A2 do grupo A/C em relação aos carreadores do alelo selvagem, condizente com o fenótipo descrito *in vitro*. De modo diferente, portadores da variante *CYP3A5**1D do grupo A/C apresentaram concentrações significativamente menores, o que é discordante de seu fenótipo pobre metabolizador observado *in vitro* (Xie *et al.*, 2004). Não pudemos justificar este resultado, torna-se também necessário afastar a existência de outras substituições no mesmo gene que modifiquem o seu fenótipo metabolizador neste grupo de pacientes.

Ainda com relação às concentrações de testosterona, notamos alguns resultados que mereçam destaque, carreadores do alelo *PORA503V* e do alelo *CYP2C9**17 apresentaram concentrações menores de testosterona em pacientes do grupo C/C. Apesar das diferenças serem interessantes e coerentes com nossas hipóteses iniciais, não foram significativas, porém poderiam contribuir na modulação da hiperandrogenemia da forma não clássica com conseqüente impacto no fenótipo hiperandrogênico, tal como já foi observado por Pusalkar *et al.*, (2009) e Fernandez *et al.*, (2010).

Considerando a forma não clássica assintomática, é de grande interesse o conhecimento até mesmo para propósitos terapêuticos, a

identificação dos fatores que corroboram para a ausência de manifestações clínicas. Na nossa amostra de 122 pacientes com a forma assintomática, 11 foram diagnosticados na investigação dos familiares de um afetado. Notamos que, invariavelmente, apesar da presença de concentrações muito elevadas da 17-OHP, estes pacientes apresentaram concentrações de andrógenos dentro da variação normal para o sexo e idade. Consequentemente supusemos que estes indivíduos poderiam carrear variantes que atuassem na diminuição da síntese de testosterona e/ou no aumento do *clearance* hepático. A frequência alélica dos polimorfismos dos genes metabolizadores de andrógenos não diferiu entre sintomáticos e assintomáticos. Apenas duas pacientes assintomáticas carregavam o alelo *CYP2C19*17* em homozigose e cinco delas o alelo *PORA503V* em heterozigose. Entretanto, três delas também carregavam o haplótipo o *CYP3A5*3A* em heterozigose e em duas pacientes o *CYP17A1*A2* em homozigose, ambos os alelos associados ao aumento das concentrações de testosterona. Por outro lado, identificamos pacientes sintomáticas carregando os alelos acima citados, associados com o aumento do *clearance* da testosterona. Deste modo, concluímos que os alelos *CYP2C19*17* e *PORA503V* isoladamente não apresentaram efeito modulador na ausência de sintomas, especificamente neste grupo.

Na análise de grupos familiares observamos alguns resultados. O grupo familiar 1 é constituído por dois irmãos, um paciente é assintomático e a outra apresentou pubarca precoce na infância e atualmente na fase adulta irregularidade menstrual. O genótipo dos genes metabolizadores não

diferem entre eles; entretanto, a paciente sintomática possui um alelo CAG curto de 17 repetições (que aumenta a atividade de transativação do receptor), o qual é ausente no irmão assintomático. O grupo 4 é constituído por dois pacientes masculinos, um foi diagnosticado na infância com pubarca precoce e o outro irmão diagnosticado pela análise molecular, porém sem apresentação clínica. O irmão sintomático é portador de alelo CAG curto (18 repetições), enquanto que o irmão assintomático portador de alelo longo (28 repetições), além de quê, também identificamos o alelo ultrametabolizador *CYP2C19*17* neste último paciente. Estas diferenças entre o genótipo CAG do *AR* tanto no grupo familiar 1 como no 4 e adicionalmente no gene *CYP2C19* no grupo familiar 4, podem ter contribuído na variabilidade da apresentação dos sintomas nestes membros pertencentes ao mesmo grupo familiar.

Incluímos em nossa amostra duas pacientes com genótipo de forma clássica, mas com fenótipo de forma não clássica, com o intuito de identificar os fatores que estiveram implicados nesta falta de concordância genótipo-fenótipo, que ocorre em até 2% na deficiência da 21-hidroxilase (Araujo *et al.*, 2007). Nestas pacientes esperávamos encontrar alelos ultrametabolizadores para a testosterona, entretanto não observamos esta situação, ambas carregavam o haplótipo *CYP3A5*3A*. Notamos também que ambas possuíam o alelo 89L em heterozigose; porém, como já citamos anteriormente, este alelo também foi identificado nas pacientes com genótipo/fenótipo concordantes e com clitoromegalia. Observamos que estas pacientes apresentam concentrações séricas de 17-OHP e de testosterona compatíveis como a forma não clássica

apesar de carregarem genótipos de forma clássica, uma possível hipótese seria a da presença de atividade de 21-hidroxilação extra-adrenal. Recentemente, demonstramos a atividade de 21-hidroxilação extra-adrenal por citocromos hepáticos na modulação do fenótipo de perda de sal de pacientes com HAC (Gomes *et al.*, 2009). Outros citocromos hepáticos, além do *CYP2C19*17* já descrito, poderiam ter atividade extra-adrenal nestas duas pacientes. Uma vez que nosso estudo do POR foi também sítio-dirigido, não podemos ainda afastar a presença de mutações que diminuem a síntese de testosterona, como já descrito com a mutação A287P no gene do POR, que amenizou o fenótipo de virilização de paciente feminina com a forma clássica (Scott *et al.*, 2007).

De modo geral, identificamos um alto índice de genótipos em heterozigose em nossos pacientes, e comumente as mudanças funcionais descritas para variantes refere-se aos genótipos em homozigose. Além disso, também é previsto que estudos *in vitro* não reproduzam as condições exatas de um organismo. Estes fatores podem ter contribuído para os resultados negativos em nossos estudos de associações (Inoue *et al.*, 2006).

Em última análise, somando os dados deste trabalho com as evidências da literatura, sugerimos que o hiperandrogenismo da forma não clássica seja modulado pela expressão de diversos genes envolvidos na síntese dos andrógenos, na metabolização e na ação periférica; tendo portanto, um caráter poligênico. A existência de inúmeros genes com diversas variantes alélicas, bem como da presença de vários co-fatores

talvez não permitam identificar uma única variante que possa se correlacionar com uma manifestação fenotípica em um grupo étnico específico; mas talvez possam justificar o fenótipo de casos individuais.

VIII. CONCLUSÕES

- 1) A média do número de repetições CAG do exon 1 do receptor de andrógenos não diferiu daquela encontrada na população normal brasileira, bem como a frequência de desvio de inativação do cromossomo X.
- 2) As frequências observadas para os polimorfismos *CYP3A5*3C*, *CYP3A5*6*, *CYP3A5*1D*, *CYP3A7*1C*, *CYP3A4*18*, *CYP2C19*17*, *CYP17A1*A2*, *PORA503V*, *SRD5A2 V89L* e *SRD5A2 A49T* no presente estudo, não diferiram significativamente da frequência descrita em populações normais de outros grupos étnicos.
- 3) Identificamos uma influência do trato CAG na comparação entre os grupos pediátrico e adulto com genótipo C/C no qual o último grupo teve uma frequência significativamente maior de tratos longos.
- 4) Com relação ao fenótipo de virilização, identificamos correlação significativa do trato CAG com a presença de clitoromegalia, onde observamos que média ponderada do número de repetições CAG foi significativamente menor em relação aos pacientes sem clitoromegalia. Os demais polimorfismos nos genes codificadores dos citocromos P450 e da enzima 5 alfa-redutase não se associaram com este fenótipo.

-
- 5) Para as demais manifestações clínicas de hiperandrogenismo da forma não clássica observamos que o número de repetições *CAG* do *AR* e os polimorfismos dos genes *CYP3A5*, *CYP3A7*, *CYP3A4*, *CYP2C19* e *CYP17A1*, *POR* e *SRD5A2* não tiveram um efeitos modulador do fenótipo, uma vez que não houve diferença entre:
- a) os grupos de pacientes assintomáticos e sintomáticos,
 - b) idade ao diagnóstico,
 - c) as pacientes com hirsutismo isolado e com irregularidade menstrual,
 - d) a intensidade do hirsutismo (*scores* de Ferriman),
- 6) Dentre as variantes dos genes *CYP3A5*, *CYP3A7*, *CYP3A4*, *CYP2C19*, *CYP17A1*, *POR*, *SRD5A2* e o *CAG* do *AR*, identificamos correlação significativa dos portadores do alelo *CYP17A1*A2* com concentrações maiores de testosterona em relação aos carreadores da variante selvagem.

IX. ANEXOS

Tabela 1a. Dados clínicos de pacientes com a forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase

nº DNA	Sexo	Idade ao Dignóstico (anos)	Prader	QC	Me	PP	HI	Fe	CL	IM
15	F	17	1	S	11	0	1	NC	1	1
23	M	7	M	S	M	1	M	0	M	M
24	F	1	0	S	13	1	0	0	0	0
26	F	30	0	AS	13	0	0	0	0	0
87	M	7	M	S	M	1	M	0	M	M
88	F	6	1	S	10,3	1	0	0	1	0
97	F	35	1	S	12	0	1	9	1	1
163	F	15	0	S	12	0	1	NC	0	1
324	F	33	0	S	12	0	1	11	0	1
340	F	47	0	S	NC	0	1	9	0	0
366	F	9	0	S	15	1	0	0	0	1
407	F	9	0	S	13	1	0	0	0	1
521	F	8	0	S	12	1	0	0	0	1
562	F	10	0	S	12	1	0	0	0	0
581	M	10	M	AS	M	0	M	0	M	M
595	F	criança	0	S	NC	1	1	22	0	1
597	F	5	0	S	NC	1	1	11	0	0
624	F	25	0	S	14	0	1	22	0	1
627	F	19	0	S	12	0	1	12	0	1
641	F	36	1	S	13	0	1	7	0	1
645	F	NC	0	AS	NC	0	0	0	0	0
673	F	7	0	S	13	1	0	0	0	0
686	F	6	0	S	NC	1	0	0	0	0
694	F	15	NC	S	10	0	1	12	1	1
729	F	42	0	AS	14	0	0	0	0	0
827	F	15	0	S	NC	0	0	0	0	0
872	F	6	0	S	NC	1	0	0	0	0
873	F	NC	NC	AS	NC	0	0	0	0	0
883	F	5	0	S	NC	1	0	0	0	0
907	F	47	0	S	16	0	1	NC	0	1
909	F	2	0	S	NC	1	0	0	0	0
913	F	5	0	S	NC	1	0	0	0	0
999	F	46	NC	S	NC	0	1	0	0	0
1030	F	adulta	0	S	NC	0	1	0	0	0
1035	F	7	0	S	12	1	0	0	0	0
1062	F	13	0	S	15	0	1	20	0	1
1266	F	17	1	S	11	0	1	NC	1	0
1364	M	8	M	S	M	0	M	0	M	M
1395	M	27	M	AS	M	0	M	0	M	M
1406	F	6	0	S	NC	1	0	0	0	0
1439	F	30	0	S	12	0	1	18	0	0

Continua...

Continuação Tabela 1a

nº DNA	Sexo	Idade ao Dignóstico (anos)	Prader	QC	Me	PP	HI	Fe	CL	IM
1453	F	42	0	S	NC	0	0	0	0	0
1535	F	19	0	S	13	0	1	6	0	1
1543	F	NC	0	S	NC	NC	NC	NC	NC	NC
1550	F	7	0	S	12	1	1	18	0	1
1551	F	0,08	NC	S	NC	NC	NC	NC	NC	NC
1624	F	NC	NC	S	NC	NC	NC	NC	NC	NC
1661	F	34	0	S	NC	0	1	NC	0	1
1664	F	6	0	S	NC	1	0	0	0	0
1670	F	9	0	S	11	1	0	0	0	0
1674	F	9	0	S	NC	1	0	0	0	0
1734	F	39	0	S	10	0	1	18	0	0
1742	F	5	0	S	NC	1	0	0	0	0
1866	F	14	0	S	14	0	1	NC	0	1
1870	F	43	0	S	NC	0	1	14	0	0
1922	F	6	0	S	NC	1	0	0	0	0
1941	F	46	0	S	NC	0	1	30	0	0
2045	F	6	1	S	12	0	1	13	1	0
2072	F	6	0	S	13	1	0	0	0	1
2116	M	3	M	S	M	1	M	0	M	M
2160	F	16	0	S	13	0	1	NC	0	1
2176	F	NC	0	S	NC	NC	NC	NC	NC	NC
2306	F	5	0	S	NC	1	0	0	0	0
2347	F	adulta	0	S	NC	0	1	12	0	0
2439	F	6	0	S	8	1	1	12	0	0
2645	F	6	NC	S	NC	1	0	0	0	0
2752	F	41	0	S	NC	0	1	NC	0	1
2933	F	7	0	S	9	0	0	0	0	1
2962	F	19	0	S	14	0	1	17	0	1
3038	F	31	0	S	NC	0	1	NC	1	0
3076	F	15	0	S	NC	0	0	0	0	1
3080	F	19	1	S	12	0	1	21	1	1
3238	F	13	0	S	NC	0	1	7	0	1
3271	F	10	0	S	NC	1	0	0	0	0
3278	M	13	M	AS	M	0	M	0	M	M
3389	F	7	0	S	NC	1	0	0	0	0
3537	F	NC	NC	S	NC	NC	NC	NC	NC	NC
3604	F	11	0	S	15	1	0	0	0	1
3623	F	NC	NC	S	NC	NC	NC	NC	NC	NC
3691	M	9	M	S	M	1	M	0	M	M
3709	F	31	0	S	NC	0	1	29	0	0
3733	F	criança	0	S	11	1	1	10	0	1
3949	M	6	M	S	M	1	M	0	M	M
3952	M	7	M	AS	M	0	M	0	M	M

Continua...

Conclusão Tabela 1a

nº DNA	Sexo	Idade ao Dignóstico (anos)	Prader	QC	Me	PP	HI	Fe	CL	IM
4006	F	4	0	S	NC	1	0	0	0	0
4008	M	30	M	AS	M	0	M	0	M	M
4197	F	16	0	S	NC	0	1	NC	0	0
4394	F	7	0	S	12	1	0	0	0	0
4600	F	12	0	S	NC	0	1	10	0	0
4777	F	45	0	S	NC	0	1	NC	0	1
4793	F	criança	0	S	15	1	0	0	0	0
5034	F	9	0	S	NC	1	0	0	0	0
5072	F	36	0	S	NC	0	0	0	0	1
5118	F	19	0	S	NC	0	1	NC	0	0
5121	F	28	1	S	14	0	1	NC	1	0
5134	F	9	0	S	11	1	0	0	0	1
5192	M	6	M	S	M	1	M	0	M	M
5199	F	35	0	S	13	0	1	32	0	0
5216	F	9	1	S	NC	1	0	0	1	0
5217	F	30	0	S	15	0	1	18	0	1
5253	F	40	0	S	13	0	1	20	0	0
5339	F	6	0	S	12	1	0	0	0	1
5368	F	6	0	S	NC	1	0	0	0	0
5386	F	12	0	S	10	1	1	9	0	1
5434	F	7	0	S	NC	1	0	0	0	0
5455	F	52	0	S	13	0	1	19	0	0
5456	M	12	M	AS	M	0	M	0	M	M
5646	F	18	0	S	13	0	0	0	0	0
5735	F	NC	NC	S	NC	NC	NC	NC	NC	NC
5860	F	16	0	S	13	0	1	15	0	0
5881	F	NC	NC	S	NC	NC	NC	NC	NC	NC
5915	F	8	0	S	NC	1	0	0	0	0
5932	F	16	0	S	9	0	1	13	0	0
6094	M	3	M	S	M	1	M	0	M	M
6169	F	10	0	S	13	1	0	0	0	0
6213	F	26	0	S	13	0	0	0	0	1
6282	F	NC	NC	S	NC	NC	NC	NC	NC	NC
6350	F	27	0	AS	NC	0	0	0	0	0
6423	F	36	0	S	NC	0	1	7	0	0
6578	F	6	0	S	NC	1	0	0	0	0
6716	F	42	0	S	NC	0	0	0	0	1
6903	F	14	0	S	NC	0	1	0	0	0

PP: Pubarca Precoce; HI: Hirsutismo; Fe: score de Ferriman; IM: Irregularidade Menstrual; CL: Clitoromegalia; NC: não consta ou dado obtido após o início do tratamento; AS: Assintomático; S: sintomático; Sexo: M: Masculino, F: Feminino; QC: quadro clínico; Criança: diagnóstico na infância, a idade não pode ser definida; Adulta: diagnóstico na vida adulta, a idade não pode ser definida.

Tabela 1b. Dados hormonais dos pacientes com a forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase

nº DNA	17-OHP Basal (ng/mL)	17-OHP Pico (ng/mL)	Andro (ng/mL)	Testo (ng/dL)	F (µg/dL)	F Pico (µg/dL)
15	24,0	NC	9,4	234	NC	NC
23	18	NC	1,9	24	9	NC
24	4	55	1,2	27	15	29
26	4,4	55,4	1,5	27,5	15	29
87	40,0	NC	0,7	14	9,5	NC
88	6,5	67,6	0,6	26	10	33
97	82,0	NC	13,7	83	24	NC
163	3,4	30,8	3,0	89	19	51
324	47,0	NC	NC	53	26	NC
340	4,4	88,0	NC	94	13	NC
366	32	NC	3,8	122	11	25
407	8,6	36,0	0,5	39	30,6	26
521	26	NC	1,7	26	13	NC
562	6,0	121,0	0,6	35	8	17
581	44,0	NC	0,5	24	11	NC
595	17,3	86,0	3,9	117	6,7	15
597	17,0	NC	1,4	80	15	NC
624	2,9	23,7	3,2	78	9,8	32
627	5,9	15,0	4,1	110	20	32
641	14,0	15,0	1,2	45	0,2	NC
645	1,9	58,0	0,2	19	NC	NC
673	38,0	NC	0,7	28	14,7	NC
686	8,7	84,0	0,3	22	5,9	14
694	26,0	121,0	4,1	44	8,5	12
729	2,6	44,0	1,5	61	4,6	17
827	6,7	19,0	4,6	142	NC	NC
872	0,4	63,0	0,5	<10	1,9	17,5
873	NC	NC	NC	NC	NC	NC
883	18,5	50,0	2,0	NC	23	30
907	25,0	118,0	1,8	61	8,6	16
909	NC	NC	NC	NC	NC	NC
913	0,3	17,0	0,6	NC	7,4	34
999	1,3	60,0	2,4	126	3,9	11
1030	22,0	NC	5,3	117	14	19
1035	16,7	27,0	5,4	92	NC	NC
1062	6,1	41,0	3,0	50	16,7	NC
1266	22,0	56,0	2,0	73	11	13
1364	3,2	6,0	3,3	15	11	15
1395	17,0	NC	2,7	510	NC	NC
1406	5,9	NC	0,4	NC	16	NC
1439	3,5	27,0	2,1	86	5,8	14
1453	2,5	25,0	2,2	260	NC	NC

Continua...

Continuação Tabela 1b

nº DNA	17-OHP Basal (ng/mL)	17-OHP Pico (ng/mL)	Andro (ng/mL)	Testo (ng/dL)	F (µg/dL)	F Pico (µg/dL)
1535	10,0	18,0	3,8	176	NC	NC
1543	NC	NC	NC	NC	NC	NC
1550	20,0	68,0	NC	155	14	19
1551	14,0	22,0	2,3	NC	6,1	7,3
1624	NC	NC	NC	NC	NC	NC
1661	2,1	35,0	1,3	34	6,9	15,6
1664	0,6	19,5	1,2	NC	NC	NC
1670	14,0	22,0	1,7	27	17	7,3
1674	NC	32,0	2,1	67	NC	NC
1734	5,4	49,0	NC	51	NC	NC
1742	8,7	84,0	0,3	22	7,8	14
1866	4,2	44,0	NC	53,16	NC	NC
1870	3,2	72,0	1,2	33	4,3	15
1922	67	75	3,8	29	NC	NC
1941	5,9	56,0	2,1	59	NC	NC
2045	2,9	17,0	1,9	62	7,2	15,8
2072	37,5	51,3	1,6	28	11	13,7
2116	12,8	NC	1,3	23	NC	NC
2160	3,1	39,0	5,5	109	8	15,3
2176	80,0	NC	NC	90	NC	NC
2306	13,0	NC	2,7	26	9,2	NC
2347	13,0	31,0	1,5	39	9,8	14,6
2439	6,7	23,0	2,8	52	NC	NC
2645	44,0	74,0	NC	NC	NC	NC
2752	0,7	48,0	0,6	24,9	1	15,7
2933	39,0	25,0	2,1	80	NC	NC
2962	2,6	36,0	1,5	283	5	14
3038	38,0	NC	8,3	204	NC	NC
3076	0,4	63,0	0,5	NC	1,9	17,5
3080	15,0	NC	7,0	187	13,9	NC
3238	8,1	28,3	3,0	170	14	17
3271	6,8	19,0	3,3	42	14,6	21
3278	28,0	36,0	2,0	30	20	NC
3389	16,0	NC	2,4	35	NC	NC
3537	13	24	2	NC	NC	NC
3604	4,0	16,9	0,8	NC	NC	NC
3623	NC	NC	NC	NC	NC	NC
3691	55,6	NC	1,0	NC	7,3	24
3709	4,2	31,0	1,8	45	6,9	12
3733	26,0	34,0	6,9	121	16	19
3949	6,2	NC	1,1	29	4,3	NC
3952	8,8	NC	0,6	13	6,1	NC
4006	19,5	NC	0,6	5	17	NC
4008	4,7	15	NC	337	13,7	17,9

Continua...

Conclusão Tabela 1b

nº DNA	17-OHP Basal (ng/mL)	17-OHP Pico (ng/mL)	Andro (ng/mL)	Testo (ng/dL)	F (µg/dL)	F Pico (µg/dL)
4197	58,9	83,7	2,6	102	22,4	24,2
4394	30,0	77,0	2,1	17	13,9	13,3
4600	8,8	NC	2,4	47	NC	NC
4777	8,9	55,0	1,9	133	12	21
4793	12,0	34,0	NC	NC	10,3	12,4
5034	14,6	99,6	0,8	10	15	NC
5072	12,7	20,1	3,1	113	12,3	15,7
5118	14,2	69,4	3,8	55	NC	NC
5121	12,2	48,0	5,1	145,7	NC	NC
5134	44,0	74,0	NC	61	12,4	21,2
5192	14	53	1,1	17	5,7	10,2
5199	6,0	29,0	1,6	56	7	13
5216	18,0	38,0	NC	NC	13	18,6
5217	4,5	21	2,6	65	7,3	14,3
5253	10	54	0,8	24	8	15
5339	53,8	67,6	1,1	82	20,4	24,1
5368	64	255	1,16	22,7	11,4	NC
5386	11	48	NC	80	8,7	16,1
5434	2,3	43	2	31	6,8	18,8
5455	11	50	NC	28	9	17,8
5456	4,2	24,4	2,4	360	6,4	19,8
5646	20	NC	10,3	302	NC	NC
5735	NC	NC	NC	NC	NC	NC
5860	3,9	22	6,1	126	11,3	19
5881	NC	NC	NC	NC	NC	NC
5915	9,1	NC	1,7	32	8,8	NC
5932	3,2	31	2,7	64	7,9	16,2
6094	25,3	NC	1,1	23,7	NC	NC
6169	5,8	57	NC	NC	12,6	21
6213	7	NC	1,2	51	25	NC
6282	NC	NC	NC	NC	NC	NC
6350	19,97	44,6	4,3	74	12,9	15,8
6423	36,9	NC	7,9	153	19,3	NC
6578	4,7	42,4	1	NC	7,2	14,9
6716	11,0	NC	NC	NC	NC	NC
6903	4,38	22,8	3,4	86	NC	NC

17-OHP: 17-OH progesterona; 17-OHP Pico: 17-OHP após estímulo com ACTH sintético; Andro: Androstenediona; Testo: testosterona; F: Cortisol; F Pico: após estímulo com ACTH sintético; NC: não consta ou dado obtido após o início do tratamento

Tabela 2. Genótipo *CYP21A2* dos pacientes com a forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase

nº DNA	Genótipo <i>CYP21A2</i>	Grupo Genotípico
15	P30L/P30L	C/C
23	I2Sp, R356W/V281L	A/C
24	I2Sp, R356W/V281L	A/C
26	R356W/V281L	A/C
87	R356W/V281L	A/C
88	R356W/V281L	A/C
97	Conversão até P30L/IVS2 -2 G>A	A/B
163	V281L/-126C>T	C/C
324	I2Sp/V281L	A/C
340	V281L/V281L	C/C
366	Del 8nt/V281L	A/C
407	V281L/V281L	C/C
521	G424S/V281L	A/C
562	V281L/V281L	C/C
581	Del 8nt/V281L	A/C
595	P30L/V281L	C/C
597	Conversão/V281L	A/C
624	P453S/V281L	C/C
627	I2Sp/-126C>T	A/C
641	I2Sp/V281L	A/C
645	V281L/V281L	C/C
673	Conversão/V281L	A/C
686	Conversão, P30L/V281L	A/C
694	Ins T/V281L	A/C
729	V281L/V281L	C/C
827	P453S/V281L	C/C
872	Del 8nt/V281L	A/C
873	V281L/V281L	C/C
883	V281L/V281L	C/C
907	I172N/V281L	A/C
909	I2Sp/P30L	A/C
913	P453S/V281L	C/C
999	V281L/R356W	A/C
1030	I2Sp, Del 8nt/V281L	A/C
1035	I2Sp/V281L	A/C
1062	V281L/V281L	C/C
1266	Conversão/V281L	A/C
1364	P453S/V281L	C/C
1395	P453S/V281L	C/C

Continua...

Continuação Tabela 2

nº DNA	Genótipo <i>CYP21A2</i>	Grupo Genotípico
1406	V281L/V281L	C/C
1439	V281L/V281L	C/C
1453	V281L/V281L	C/C
1535	V281L/V281L, Ins T	A/C
1543	V281L/V281L	C/C
1550	Conversão/V281L	A/C
1551	I2Sp/V281L	A/C
1624	Q318X/V281L	A/C
1661	Ins T/V281L	A/C
1664	Deleção/Ins T,V281L	A/A
1670	R356W/V281L	A/C
1674	I2Sp/V281L	A/C
1734	V281L/V281L	C/C
1742	I2Sp/V281L	A/C
1866	V281L/V281L	C/C
1870	V281L/V281L	C/C
1922	I2Sp/V281L	A/C
1941	V281L/V281L	C/C
2045	V281L/V281L	C/C
2072	I2Sp,V281L/V281L	A/C
2116	V281L/V281L	C/C
2160	Del 8nt/P453S	A/C
2176	R356W,Q318X/V281L	A/C
2306	V281L/V281L	C/C
2347	V281L/V281L	C/C
2439	V281L/V281L	C/C
2645	Del 21B/V281L	A/C
2752	Q318X/V281L	A/C
2933	P453S/V281L	C/C
2962	V281L/V281L	C/C
3038	I2Sp/V281L	A/C
3076	V281L/V281L	C/C
3080	I2Sp/V281L	A/C
3238	V281L/V281L	C/C
3271	V281L/V281L	C/C
3278	I2Sp, Q318X/P453S	A/C
3389	V281L/V281L	C/C
3537	I2Sp/P453S	A/C
3604	V281L/V281L	C/C
3623	I2Sp,V281L/V281L	A/C
3691	V281L/V281L	C/C
3709	V281L/V281L	C/C
3733	V281L/V281L	C/C
3949	V281L,Q318X/V281L	A/C

Continua...

Conclusão Tabela 2

nº DNA	Genótipo <i>CYP21A2</i>	Grupo Genotípico
3952	V281L/V281L	C/C
4006	V281L/V281L	C/C
4008	V281L/V281L	C/C
4197	Cluster/V281L	A/C
4394	I2Sp,V281L/V281L	A/C
4600	V281L/V281L	C/C
4777	V281L/V281L	C/C
4793	V281L/V281L	C/C
5034	I2Sp/V281L	A/C
5072	I2Sp/V281L	A/C
5118	V281L/Q318X	A/C
5121	Q318X/V281L	A/C
5134	P453S/V281L	C/C
5192	I2Sp/V281L	A/C
5199	V281L/V281L	C/C
5216	V281L/V281L	C/C
5217	V281L/V281L	C/C
5253	V281L/V281L	C/C
5339	I2Sp/V281L	A/C
5368	I2Sp/V281L	A/C
5386	LR/V281L	A/C
5434	V281L/V281L	C/C
5455	LR/V281L	A/C
5456	Conversão/V281L	A/C
5646	I2Sp/V281L	A/C
5735	V281L/V281L	C/C
5860	LR/V281L	C/C
5881	V281L/V281L	C/C
5915	V281L/1630^1631 ins C	A/C
5932	V281L/V281L	C/C
6094	I2Sp/P30L	A/C
6169	LR/V281L	A/C
6213	LR/V281L	A/C
6282	LR/V281L	A/C
6350	I2Sp/V281L	A/C
6423	LR/V281L	A/C
6578	V281L/V281L	C/C
6716	V281L/V281L	C/C
6903	V281L/V281L	C/C

LR: grande rearranjo gênico; Deleção: deleção do gene *CYP21A2*; Del: deleção; Sp: splice; ins: inserção; IVS: intron; nt: nucleotídeo, A/C: genótipo de forma não clássica que prediz grave comprometimento da atividade enzimática residual; C/C: genótipo de forma não clássica que prediz moderado comprometimento da atividade residual; A/A e A/B: genótipos da 21-OH que predizem o fenótipo de forma clássica

Tabela 3. Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados nas reações de PCR e seqüenciamento

Polimorfismos	Ref. NCBI	Método de Rastreamento	Localização <i>Genebank</i>	Sequência dos <i>Primers</i>	T ° de annealing	Tamanho do fragmento amplificado	Ref.
A6986G CYP3A5*3C	rs776746	Sequenciamento	chr7:37303577-37303555 chr7:37303208-37303227	5' TTGTGAGCACTTGATGATTTACC 3' 5' CCAGGAAGCCAGACTTTGAT 3'	60 °C	370 pb	Willrich <i>et al.</i> , 2008
G14690A CYP3A5*6	rs10264272	Sequenciamento	chr7:37295858-37295839 chr7:37295456-37295480	5' GTGGGTTTCTTGCTGCATGT 3' 5' GGCTCTAGATTGACAAAAACATTTT 3'	62 °C	403 pb	Willrich <i>et al.</i> , 2008
C31611T CYP3A5*1D	rs15524	Sequenciamento	chr7:37279050-37279026 chr7:37278673-37278694	5' TGCTTTTACTATCCAGTATTTACCC 3' 5' GCCCATCTTTATTTCAAGGTTT 3'	60 °C	378 pb	Willrich <i>et al.</i> , 2008
L293P CYP3A4*18	rs28371759	PCR-RFLP Enzima: <i>MspI</i>	chr7:37394615-37394596 chr7:37394186-37394205	5' CCAGTGACCTCTGAATTGC 3' 5' CAGAGCCTTCCTACATAGAG 3'	58 °C	431 pb	Sata <i>et al.</i> , 2000
(-) 34 T>C CYP17 A2	rs743572	PCR-RFLP Enzima: <i>MspA1</i>	chr10:55401904-55401887 chr10:55401491-55401508	5' CATTTCGCACTCTGGAGTC 3' 5' AGGCTCTTGGGGTACTTG 3'	57 °C	459 pb	Adam <i>et al.</i> , 1994
A49T SRD5A2	rs9282858	PCR-RFLP Enzima: <i>MwoI</i>	chr2:10627802-10627782 chr2:10627682-10627702	5' ACCCTTGGGGCACTGGCCTTG 3' 5' GTCAGCTCCTGCAGGAACCAG 3'	55 °C	122 pb	Li <i>et al.</i> , 2003
V89L SRD5A2	rs523349	PCR-RFLP Enzima: <i>RsaI</i>	chr2:10627626-10627607 chr2:10627503-10627522	5' CCACCTGGGACGGTACTTCT 3' 5' CTCCACGCTGCGCTCCTGGA 3'	55 °C	124 pb	Li <i>et al.</i> , 2003
(-) 806 C>T CYP2C19*17	rs12248560	PCR-RFLP Enzima: <i>MnLI</i>	chr10:47323258-47323277 chr10:47324123-47324103	5' GACCTTGATCTGGCAATGGT 3' 5' TGCAGTGTTGGCATAGTTTTG 3'	53 °C	866 pb	Gomes <i>et al.</i> , 2009
A503V POR	rs1057868	Sequenciamento	chr7:13647599-13647618 chr7:13648362-13648341	5' GAGGGGGCCTCTGAGGTTTG 3' 5' ACAGGTGCTCTCGGTCTTGCTT 3'	60 °C	764 pb	Gomes <i>et al.</i> , 2008
UTR 5' -188/-129 CYP3A7*1C		Sequenciamento	chr7:37366088-37366067 chr7:37365475-37365503	5' GGCTCTGTCTGGCTGGGTATGA 3' 5' GAACAGTTACTCACAGATAGAGGAGTATC 3'	62 °C	614 pb	Burk <i>et al.</i> , 2002

PCR-RFLP: reação em cadeia da polimerase seguida de ensaio de digestão enzimática; chr: cromossomo; UTR: região não-traduzida; pb: pares de base; Ref.: Referência bibliográfica; NCBI: National Center for Biotechnology Information

Tabela 4. Número de repetições CAG do trato poliglutamina e o padrão de inativação do cromossomo X em pacientes com a forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase

nº DNA	Alelo A (nCAG)	Inativação X Alelo A (%)	Alelo B (nCAG)	Inativação X Alelo B (%)	Média Ponderada (nCAG)
15	16	27,5	25	72,5	18,5
23	22	50,0	22	50,0	22,0
24	22	62,1	23	38,0	22,5
26	21	15,0	22	85,0	21,1
87	23	50,0	23	50,0	23,0
88	19	70,4	24	29,6	22,4
97	18	65,7	19	34,3	18,7
163	21	48,4	26	51,6	23,4
324	21	50,0	21	50,0	21,0
340	20	48,5	21	51,5	20,5
366	17	40,6	22	59,5	19,0
407	15	37,7	16	62,3	15,4
521	23	40,0	25	60,0	23,7
562	23	56,2	25	43,8	24,1
581	22	50,0	22	50,0	22,0
595	16	25,6	26	74,4	18,6
597	23	61,0	26	39,0	24,8
624	21	50,0	21	50,0	21,0
627	15	63,9	16	36,1	15,6
641	21	47,1	25	52,9	22,9
645	24	50,9	28	49,1	26,1
673	22	39,8	29	60,2	24,8
686	22	36,4	24	63,6	22,7
694	20	23,0	25	77,0	21,0
729	19	39,0	22	61,0	20,2
827	20	53,0	21	47,0	20,5
872	16	18,5	26	81,5	17,8
873	21	45,0	25	55,0	22,8
883	19	62,0	24	38,0	22,1
907	21	44,3	22	55,7	21,4
909	19	79,8	21	20,2	20,6
913	22	38,0	25	62,0	23,0
999	19	59,7	21	40,3	20,2
1030	21	47,0	22	53,0	21,5
1035	12	36,1	22	63,9	15,6
1062	16	42,1	26	57,9	20,2
1266	20	33,0	28	67,0	22,6
1364	25	50,0	25	50,0	25,0
1395	14	50,0	14	50,0	14,0
1406	23	65,7	24	34,3	23,5

Continua...

Continuação Tabela 4

nº DNA	Alelo A (nCAG)	Inativação X Alelo A (%)	Alelo B (nCAG)	Inativação X Alelo B (%)	Média Ponderada (nCAG)
1439	21	51,0	24	49,0	22,5
1453	26	46,6	29	53,4	27,4
1535	15	39,6	20	60,4	17,0
1543	19	50,0	19	50,0	19,0
1550	20	23,7	23	76,4	20,7
1551	21	61,1	23	38,9	22,2
1624	18	72,2	24	27,8	22,3
1661	23	35,0	26	65,0	24,1
1664	19	56,4	25	43,6	22,4
1670	21	66,6	26	33,4	24,3
1674	14	38,9	23	61,1	17,5
1734	21	60,0	24	40,0	22,8
1742	19	36,0	25	64,0	21,2
1866	21	42,7	24	57,4	22,3
1870	21	37,4	22	62,6	21,5
1922	22	61,7	25	38,3	23,8
1941	21	36,9	22	63,1	20,4
2045	17	21,9	21	78,1	17,9
2072	21	17,7	23	82,3	21,4
2116	21	50,0	21	50,0	21,0
2160	24	50,9	25	49,1	24,5
2176	22	44,0	25	56,0	22,9
2306	21	34,8	24	65,2	22,0
2347	26	50,0	26	50,0	26,0
2439	15	44,4	20	55,6	17,2
2645	19	64,0	23	36,0	21,6
2752	21	53,8	24	46,2	22,6
2933	16	41,3	25	58,7	19,7
2962	22	51,8	29	48,2	25,6
3038	17	69,8	23	30,2	21,2
3076	22	73,5	26	26,5	24,9
3080	15	55,9	20	44,1	17,3
3238	21	20,2	28	79,8	22,4
3271	19	36,7	24	63,3	20,8
3278	23	50,0	23	50,0	23,0
3389	18	46,5	23	53,5	20,3
3537	12	38,1	24	61,9	16,6
3604	22	28,5	23	71,5	22,3
3623	23	63,9	26	36,1	24,9
3691	25	50,0	25	50,0	25,0
3709	21	25,4	22	74,7	21,3
3733	21	50,0	21	50,0	21,0
3949	18	50,0	18	50,0	18,0

Continua...

Conclusão Tabela 4

nº DNA	Alelo A (nCAG)	Inativação X Alelo A (%)	Alelo B (nCAG)	Inativação X Alelo B (%)	Média Ponderada (nCAG)
3952	28	50,0	28	50,0	28,0
4006	19	40,5	24	59,5	21,0
4008	19	50,0	19	50,0	19,0
4197	20	32,1	23	67,9	19,7
4394	18	82,7	20	17,3	22,0
4600	22	50,0	22	50,0	16,2
4777	16	19,9	17	80,1	19,8
4793	19	40,3	21	59,8	18,3
5034	20	22,1	23	77,9	20,7
5072	26	51,8	27	48,2	26,5
5118	17	52,6	27	47,4	22,3
5121	14	29,0	18	71,0	15,2
5134	19	75,3	25	24,7	23,6
5192	23	50,0	23	50,0	23,0
5199	19	77,0	21	23,0	20,5
5216	15	16,0	21	84,0	16,0
5217	16	69,7	25	30,3	22,2
5253	19	65,2	20	34,8	19,6
5339	23	41,2	25	58,9	23,8
5368	18	17,0	20	83,0	18,3
5386	22	71,8	23	28,2	22,7
5434	19	50,0	19	50,0	19,0
5455	19	73,1	24	26,9	22,6
5456	22	50,0	22	50,0	22,0
5646	22	54,0	30	46,0	26,3
5735	21	57,8	25	42,2	23,3
5860	21	57,0	25	43,0	23,2
5881	21	50,0	21	50,0	21,0
5915	21	63,0	30	37,0	26,7
5932	20	50,0	20	50,0	20,0
6094	20	50,0	20	50,0	20,0
6169	19	55,4	26	44,6	21,5
6213	19	29,0	31	71,0	22,4
6282	21	34,4	29	65,6	23,7
6350	21	50,0	21	50,0	21,0
6423	22	50,0	22	50,0	22,0
6578	21	62,0	23	38,0	22,1
6716	22	50,0	22	50,0	22,0
6903	19	50,0	19	50,0	19,0

nCAG: número de repetições CAG do exon 1 do receptor de andrógenos; X: cromossomo X

Tabela 5. Comparação do nCAG do *AR* entre os indivíduos normais e pacientes com a forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase, distribuídos de acordo com o início dos sintomas

Grupos (nº de indivíduos)	nCAG	
	Variação	Média ± DP
Pacientes (n=122)	12 -- 31	21,4 ± 2,6
Grupo Controle (n=89)	10 -- 31	21,9 ± 3,3
Grupo Pediátrico (n=54)	12 -- 30	22,2 ± 3,1
Grupo Adulto (n=47)	16 -- 31	22,6 ± 3,5
Grupo Assintomáticos (n=11)	14 -- 28	22,4 ± 3,6

nCAG: número de repetições CAG do exon 1 do receptor de andrógenos; $p > 0,05$

Tabela 6. Frequência de alelos curtos (≤ 18 repetições) e longos (≥ 26 repetições) do trato CAG do AR entre os indivíduos normais e pacientes com a forma não clássica, distribuídos de acordo com o início dos sintomas

Grupos (nº de indivíduos)	Trato CAG curto (nº alelos) / Freq (%)	Trato CAG longo (nº alelos) / Freq (%)
Grupo Pediátrico (n=54)	(16) 15%	(7) 6,6%
Grupo Adulto (n=47)	(14) 14%	(16) 16%
Grupo Assintomáticos (n=11)	(2) 9%	(3) 13%
Grupo Controles (n=89)	(22) 12,3%	(23) 12,9%

Freq: Frequência alélica; $p > 0,05$; AR: Receptor de Andrógenos

Tabela 7. Comparação entre as frequências de alelos curtos (≤ 18 repetições) e longos (≥ 26 repetições) do trato CAG do AR entre os grupos pediátrico e adulto dos diferentes genótipos da 21-hidroxilase

	Grupo Genótipo A/C			Grupo Genótipo C/C		
	Grupo Etário	Genótipo	Freq. Alélica (%)	Grupo Etário	Genótipo	Freq. Alélica (%)
Alelos Curtos	Pediátrico	A/C	13	Pediátrico	C/C	16
	Adulto	A/C	18 <i>p=0,50</i>	Adulto	C/C	9 <i>p=0,28</i>
Alelos Longos	Pediátrico	A/C	10	Pediátrico	C/C	2
	Adulto	A/C	15 <i>p=0,37</i>	Adulto	C/C	17 <i>p=0,01</i>

A/C: genótipo de forma não clássica que prediz grave comprometimento da atividade residual; C/C: genótipo de forma não clássica que prediz moderado comprometimento da atividade residual; Freq.: frequência

Tabela 8. Comparação entre as frequências de alelos curtos (≤ 18 repetições) e longos (≥ 26 repetições) do trato CAG do AR entre os genótipos da 21-hidroxilase e os grupos pediátrico e adulto

Grupo Genótipo A/C				Grupo Genótipo C/C			<i>p</i>
	Grupo Etário	Genótipo	Freq. Alélica (%)	Grupo Etário	Genótipo	Freq. Alélica (%)	A/C x C/C
Alelos Curtos	Pediátrico	A/C	13	Pediátrico	C/C	16	$p=0,63$
	Adulto	A/C	18	Adulto	C/C	9	$p=0,22$
Alelos Longos	Pediátrico	A/C	10	Pediátrico	C/C	2	$p=0,09$
	Adulto	A/C	15	Adulto	C/C	17	$p=0,85$

A/C: genótipo de forma não clássica que prediz grave comprometimento da atividade residual; C/C: genótipo de forma não clássica que prediz moderado comprometimento da atividade residual; Freq.: frequência

Tabela 9. Frequência de inativação randômica e de desvio de inativação do cromossomo X em pacientes heterozigotas para o nCAG do *AR* e em controles

Grupos	Padrão de Inativação	
	≤ 74%	≥ 75%
	nº pacientes / Freq (%)	nº pacientes / Freq (%)
*Pacientes	77(87)	14 (13)
Controles	62 (78)	18 (22)

*Excluído: 31 pacientes (Assintomáticos e Homozigotos); Freq: Frequência; $p>0,05$

Tabela 10. Frequência alélica dos polimorfismos dos genes relacionados à síntese, metabolismo e ação periférica dos andrógenos em diversas populações e no presente estudo

Alelo / População	Frequência Alélica						nº total alelos
	Alelo ancestral			Variante alélica			
	Alelo	Frequência	nº de alelos	Alelo	Frequência	nº de alelos	
CYP17A1*A2							
CEU	A	0,619	140	G	0,381	86	226
JPT	A	0,541	93	G	0,459	79	172
LWK	A	0,689	124	G	0,311	56	180
TSI	A	0,591	104	G	0,409	72	176
HC-FMUSP	A	0,602	147	G	0,398	97	244
CYP3A5*3							
ASW	T	0,632	67	C	0,368	39	106
CEU	T	0,036	8	C	0,964	214	222
JPT	T	0,267	46	C	0,733	126	172
MKK	T	0,514	147	C	0,486	139	286
TSI	T	0,051	9	C	0,949	167	176
HC-FMUSP	T	0,197	48	C	0,803	196	244
CYP3A5*6							
ASW	C	0,915	97	T	0,085	9	106
CEU	C	1,000	118	T	0,000	0	118
JPT	C	0,994	169	T	0,006	1	170
MKK	C	0,853	244	T	0,147	42	286
TSI	C	0,994	175	T	0,006	1	176
HC-FMUSP	C	0,960	230	T	0,040	10	244
CYP3A5*1D							
MKK	A	0,577	165	G	0,423	121	286
LWK	A	0,289	52	G	0,711	128	180
YRI	A	0,274	62	G	0,726	164	226
HC-FMUSP	G	0,189	46	C	0,811	198	244
SRD5A2 V89L							
CEU	G	0,810	23	C	0,190	97	120
CHB	G	0,520	43	C	0,480	47	90
YRI	G	0,710	27	C	0,290	93	120
HC-FMUSP	G	0,688	168	C	0,312	76	244
CYP2C19*17							
CEU	C	0,783	94	T	0,217	26	120
CHB	C	0,978	88	T	0,022	2	90
JPT	C	1,000	90	T	0,000	0	90
YRI	C	0,725	87	T	0,275	33	120
HC-FMUSP	C	0,860	210	T	0,140	34	244

Continua...

Conclusão Tabela 10

População	Frequência Alélica						
	Alelo ancestral			Variante alélica			nº total alelos
	Alelo	Frequência	nº de alelos	Alelo	Frequência	nº de alelos	
SRD5A2 A49T							
CAUC	G	0,984	120	C	0,016	2	122
AFR	G	0,979	92	C	0,021	2	94
HC-FMUSP	G	0,992	242	C	0,008	2	244
POR A503V							
CAUC	C	0,710	88	T	0,290	36	124
AFR	C	0,739	68	T	0,261	24	92
HISP	C	0,630	58	T	0,370	34	92
HC-FMUSP	C	0,750	183	T	0,250	61	244
CYP3A7*1C							
CAUC	UTR 5' -188/-129	0,965	245	UTR 5' -188/-129	0,035	9	254
HC-FMUSP	UTR 5' -188/-129	0,970	237	UTR 5' -188/-129	0,030	7	244

Descritores populacionais: CEU: Comunidade Européia; ASW: Afro-americanos do sudoeste do Estados Unidos; CHB: China, Beijing; JPT: Tokio, Japão; LWK: Luhya Webuye, Kenya; MEX: Guadalajara, México; MKK: Maasai Kinyawa, Kenya; TSI: Toscana, Itália; YRI: Yoruba, Nigéria; Cauc: Caucasianos; HISP: Espanha; HC-FMUSP: Presente estudo; Dados populacionais obtidos no banco de dados "International HapMap Project": <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.en> (acesso em abril/2010)

Tabela 11. Concentrações de testosterona (ng/dL) em mulheres adultas sintomáticas de acordo com o genótipo da 21-OH e dos genes relacionados à síntese e/ou metabolismo da testosterona

Alelos WT/M	Testosterona (ng/dL) Grupo Genótipo A/C	p (WT vs M)	Testosterona (ng/dL) Grupo Genótipo C/C	p (WT vs M)	p (AC vs CC)
<i>CYP2C19</i> *17 WT	76,5 (49-135)	0,75	86 (56-121)	0,55	0,7
<i>CYP2C19</i> *17 M	109 (34-187)		59,1 (49,1-95,5)		0,59
<i>CYP3A5</i> *3C WT	145,7 (1 paciente)	0,12	101,5 (86-117)	0,08	0,39
<i>CYP3A5</i> *3C M	64 (44-110)		91,5 (54,6-151,5)		0,13
<i>CYP3A5</i> *1D WT	160,8 (112,8-190)	0,04	117 (1 paciente)	0,16	0,01
<i>CYP3A5</i> *1D M	61 (44-110)		89 (56-133)		0,15
<i>CYP3A5</i> *6 WT	80 (45-145,7)	NA	71,5 (52,1-110)	0,97	0,99
<i>CYP3A5</i> *6 M	NA		117 (33-121)		NA
<i>SRD5A2</i> *V89L WT	87,5 (49-127,85)	0,61	78 (47-117)	0,73	0,95
<i>SRD5A2</i> *V89L M	61 (44-126)		86 (53,2-121)		0,8
<i>CYP17A1</i> *A2 WT	57 (36-87,5)	0,04	87,5 (51-133)	0,70	0,17
<i>CYP17A1</i> *A2 M	145,7 (126-153)		71,5 (53,2-121)		0,01
<i>CYP3A7</i> *1C WT	76,5 (45-145,7)	0,48	71 (50,5-121,5)	0,67	0,99
<i>CYP3A7</i> *1C M	126 (1 paciente)		94 (65-121)		0,45
<i>POR A503V</i> WT	58 (44,5-127,8)	0,40	89 (51-120)	0,85	0,41
<i>POR A503V</i> M	117,5 (102-153)		65 (50-86)		0,3

WT: alelo wild type; M: alelo mutado; A/C: genótipo de forma não clássica que prediz grave comprometimento da atividade enzimática residual; C/C: genótipo de forma não clássica que prediz moderado comprometimento da atividade enzimática residual; NA: dado não disponível

Tabela 12. Idade ao diagnóstico (anos) da forma não clássica de acordo com o genótipo da 21-OH e dos genes relacionados à síntese e/ou metabolismo da testosterona

Alelos WT/M	Idade ao diagnóstico (anos) Grupo Genótipo A/C	p (WT vs M)	Idade ao diagnóstico (anos) Grupo Genótipo C/C	p (WT vs M)	p (AC vs CC)
<i>CYP2C19</i> *17 WT	10 (6-29)	0,82	14 (6-19)	0,62	0,61
<i>CYP2C19</i> *17 M	11,5 (7-20)		9 (5,5-16)		0,68
<i>CYP3A5</i> *3C WT	12 (6-21)	0,84	5,5 (5-12)	0,34	0,12
<i>CYP3A5</i> *3C M	10 (7-35)		15 (7-19)		0,85
<i>CYP3A5</i> *1D WT	12,5 (6-28)	0,48	9 (6-26)	0,63	0,32
<i>CYP3A5</i> *1D M	10 (7-35)		15 (7-19)		0,96
<i>CYP3A5</i> *6 WT	12 (7-30)	0,23	10,5 (6-19)	0,83	0,53
<i>CYP3A5</i> *6 M	6 (5-13)		18		0,56
<i>SRD5A2</i> *V89L WT	9 (6-36)	0,90	9 (6-19)	0,30	0,24
<i>SRD5A2</i> *V89L M	13,5 (7-25,5)		31 (15-42)		0,63
<i>CYP17A1</i> *A2 WT	16 (8-39)	0,25	9 (6-17)	0,02	0,89
<i>CYP17A1</i> *A2 M	13 (6-21)		31 (15-42)		0,71
<i>CYP3A7</i> *1C WT	10 (7-21)	0,45	13 (6-19)	0,86	0,6
<i>CYP3A7</i> *1C M	20 (6-30)		8 (5-28)		0,97
<i>POR A503V</i> WT	15 (9-28)	0,57	14 (7-19)	0,68	0,79
<i>POR A503V</i> M	8 (6-15)		8,5 (6-19)		0,98

WT: alelo wild type; M: alelo mutado; A/C: genótipo de forma não clássica que prediz grave comprometimento da atividade enzimática residual; C/C: genótipo de forma não clássica que prediz moderado comprometimento da atividade enzimática residual

Tabela 13. Score de Ferriman do hirsutismo ao diagnóstico de acordo com o genótipo da 21-OH e dos genes relacionados à síntese e/ou metabolismo

Alelos WT/M	Score de Ferriman Grupo Genótipo A/C	p (WT vs M)	Score de Ferriman Grupo Genótipo C/C	p (WT vs M)
<i>CYP2C19</i> *17 WT	12 [7-18]		18 [12-22]	
<i>CYP2C19</i> *17 M	11	p>0,05	21,5 [14-29]	p>0,05
<i>CYP3A5</i> *3A WT	NE		NE	
<i>CYP3A5</i> *3A M	16,5 [12-21]	p>0,05	14 [12-20]	p>0,05
<i>CYP3A5</i> *6 WT	11,5 [8-18,5]	p>0,05	18 [12-22]	p>0,05
<i>CYP3A5</i> *6 M	12		NE	
<i>CYP3A7</i> *1C WT	12 [9-18]	p>0,05	18 [12-22]	p>0,05
<i>CYP3A7</i> *1C M	NE		14	
<i>SRD5A2</i> V89L WT	18 [9-19]		18 [13-22]	
<i>SRD5A2</i> V89L M	11 [7-12]	p>0,05	15,5 [12-20]	p>0,05
<i>CYP17A1</i> *A2 WT	19		17,5 [13-20]	
<i>CYP17A1</i> *A2 M	13,5 [7,5-19,5]	p>0,05	12 [10-20]	p>0,05
<i>POR</i> A503V WT	11,5 [7-12]		16 [12-20]	
<i>POR</i> A503V M	13,5 [9-18]	p>0,05	20 [13-29]	p>0,05

WT: alelo wild type; M: alelo mutado; *CYP3A5**3A: Haplótipo formado pelos alelos *CYP3A5**3C e *CYP3A5**1D; A/C: genótipo de forma não clássica que prediz grave comprometimento da atividade enzimática residual; C/C: genótipo de forma não clássica que prediz moderado comprometimento da atividade enzimática residual. NE: dado não disponível

Tabela 14. Análise multigênica correlacionando as variantes alélicas, os sintomas, *score* de Ferriman, idade ao diagnóstico e o número de sintomas hiperandrogênicos

Alelos	SS	ID	Fer	CL	HI	PP	T
<i>CYP2C19*17</i>	0,03	0,31	0,78	0,93	0,58	0,81	0,81
<i>CYP3A5*3A</i>	0,77	0,28	0,77	0,77	0,98	0,3	0,15
<i>CYP3A5*6</i>	0,68	0,89	0,82	0,35	0,18	0,12	0,21
<i>CYP3A7*1C</i>	0,46	0,4	0,97	0,23	0,18	0,57	0,86
<i>CYP17A1*A2</i>	0,83	0,37	0,37	0,26	0,74	0,97	0,39
<i>SRD5A2 V89L</i>	0,44	0,39	0,35	0,76	0,22	0,12	0,85
<i>POR A503V</i>	0,08	0,08	0,12	0,59	0,58	0,23	0,84

SS: Soma de sintomas (Hirsutismo associado à irregularidade menstrual); ID: idade ao diagnóstico; Fer: *score* de Ferriman do hirsutismo; CL: clitoromegalia; HI: Hirsutismo; PP: pubarca precoce; T: concentrações de testosterona ao diagnóstico

Tabela 15. Genótipos dos genes metabolizadores, do nCAG do AR e o padrão de inativação do cromossomo X entre os grupos familiares

Grupo	nº DNA	CYP2C19*17	CYP3A5*3	CYP3A5*1D	CYP3A5*6	V89L SRD5A2	A49T SRD5A2	CYP17A1*A2	CYP3A7*1C	PORA503V	CAG Média Ponderada	Alelo A	Inat. Alelo A (%)	Alelo B	Inat. Alelo B (%)
1	366	C	G	T	C	G	A	C/T	WT	A/V	19,0	17	40,6	22	59,5
	581	C	G	T	C	G	A	C/T	WT	A/V	22,0	22	50,0	22	50,0
2	1734	C	A/G	C/T	C	C	A	C	WT	A	22,8	21	60,0	24	40,0
	1870	C	A/G	C/T	C/T	G/C	A	C/T	WT	A	21,5	21	37,4	22	62,6
	1941	C	A/G	C/T	C	C	A	C	WT	A	20,4	21	36,9	22	63,1
3	2072	C	G	T	C	G	A	C/T	WT	A	21,4	21	17,7	23	82,3
	2116	C	G	T	C	G	A	C/T	1C/WT	A/V	21,0	21	50,0	21	50,0
4	3949	C	G	T	C	G/C	A	C	WT	A/V	18,0	18	50,0	18	50,0
	3952	C/T	G	T	C	G	A	C	WT	A/V	28,0	28	50,0	28	50,0
5	5034	C	G	T	C	G/C	A	C/T	WT	A	20,7	20	22,1	23	77,9
	5192	C	A/G	C/T	C/T	G/C	A	C/T	WT	A	23,0	23	50,0	23	50,0
6	5386	C	A/G	C/T	C	C	A	C/T	WT	V	22,7	22	71,8	23	28,2
	5456	C	A/G	T	C	G/C	A	C	WT	A/V	22,0	22	50,0	22	50,0
7	23	C/T	A/G	C/T	C	G	A	C/T	WT	A/V	22,0	22	50,0	22	50,0
	24	C	A	C	C	G	A	C/T	WT	A/V	22,5	22	62,1	23	38,0
8	87	C	A/G	C/T	C	G/C	A	C	WT	V	23,0	23	50,0	23	50,0
	88	C	G	T	C	G	A	T	WT	V	22,4	19	70,4	24	29,6

WT: Wild Type; Inat.: Inativação; nº: número; AR: Receptor de Andrógenos

Figura 11. Eletroferograma de produto de PCR do trato CAG do exon 1 do AR com amostras de DNA digerida e não digerida pela *HpaII* de uma mesma paciente heterozigota para o nCAG. Análise pelo software Genescan.

Exemplificação do Cálculo:

A altura do pico do alelo menor (preferencialmente amplificado) é dividida pela altura do pico do alelo maior, para se verificar quantas vezes o primeiro foi amplificado preferencialmente.

Fator de Correção: $\frac{4408}{2216} = 1,99$

Aplica-se o fator de correção à amostra digerida do alelo maior para normalizar o nível de amplificação entre os dois alelos.

$$1,99 \times 1320 = 2625,70$$

A soma da altura do pico dos dois alelos foi definida como 100% e determinamos a porcentagem de inativação de cada alelo.

$$4233,70 \text{ ----- } 100\%$$

$$1608 \text{ ----- } X$$

$X = 37,98\%$ (inativação do alelo menor); portanto, a inativação do alelo maior é de **62,02%**.

Figura 20. Histograma da distribuição alélica do nCAG do AR entre os pacientes com a forma não clássica e o grupo controle

Figura 21. Histograma da frequência alélica do nCAG do AR entre pacientes do grupo pediátrico, adulto e indivíduos assintomáticos

Figura 22. Histograma da frequência alélica de alelos curtos do nCAG do AR entre pacientes dos grupos adulto e pediátrico de acordo com genótipo A/C e C/C

Figura 23. Histograma da frequência alélica de alelos longos do nCAG do AR entre pacientes dos grupos adulto e pediátrico de acordo com o genótipo A/C e C/C

X. REFERÊNCIAS

Admoni O, Tenenbaum-Rakover Y, *et al.* Hyperandrogenism in carriers of CYP21 mutations: the role of genotype. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009; 64(6):645-51.

Akhmetova VL, Ramova ZF, *et al.* Mutational spectrum of the gene for 21-hydroxylase in the patients with congenital adrenal hyperplasia from Bashkortostan. *Genetika*. 2009;44(10): 1420-8.

Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. "Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet*. 1992;51(6):1229-39.

Araujo RS, Mendonca BB, Barbosa AS, Lin CJ, Marcondes JA, Billerbeck AE, Bachega TA. Microconversion between CYP21A2 and CYP21A1P promoter regions causes the nonclassical form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(10):4028-34.

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.

Bachega TASS, Billerbeck AE, Madureira G, Arnhold IJP, Medeiros MA, Marcondes JAM, Longui CA, Nicolau W, Bloise W, Mendonça BB. Low frequency of *CYP21B* deletions in Brazilian patients with Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Hered*. 1999;49:9-14.

Bachega TA, Billerbeck AE, *et al.* 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.

Bachega TASS, Brenilha EML, Billerbeck AEC, Marcondes JAM, Madureira G, Arnhold IJP, Mendonca BB. Variable ACTH-stimulated 17-hydroxyprogesterone values in 21-hydroxylase deficiency carriers are not related to the different CYP21 gene mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:786-90.

Bachega TA, Billerbeck AE, *et al.* Multicentric study of Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency: a genotype-phenotype correlation. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004;48(5): 697-704.

Bebermeier JH, Brooks JD, DePrimo SE, Werner R, Deppe U, Demeter J, Hiort O, Holterhus PM. Cell-line and tissue-specific signatures of androgen receptor-coregulator transcription. *J Mol Med*. 2006;84(11):919-31.

Bidet M, Bellanné-Chantelot C, Galand-Portier MB, Tardy V, Billaud L *et al.* Clinical and Molecular Characterization of a Cohort of 161 Unrelated Women with Nonclassical Congenital Adrenal Hyperplasia Due to 21-Hydroxylase Deficiency and 330 Family Members. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2009;94(5) 1570-1578.

Billerbeck AE, Mendonca BB, Pinto EM, Madureira G, Arnhold IJ, Bachega TA. Three novel mutations in CYP21 gene in Brazilian patients with the classical form of 21-hydroxylase deficiency due to a founder effect. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(9):4314-7.

Bojunga J, Welsch C, *et al.* Structural and functional analysis of a novel mutation of CYP21B in a heterozygote carrier of 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet*. 2005;117(6): 558-64.

Bolduc V, Chagnon P, Provost S, Dubé MP, Belisle C, Gingras M, Mollica L, Busque L. No evidence that skewing of X chromosome inactivation patterns is transmitted to offspring in humans. *J Clin Invest.* 2008;118:333–341.

Busque L, Mio R, Mattioli J, Brais E, Blais N, Lalonde Y, Maragh M, Gilliland DG. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood.* 1996;1996; 88: 59–65.

Bussab WO, Morettin PA. *Estatística Básica.* 4a. ed. São Paulo: Atual. 1987;321p.

Bratt O, Borg A, Kristoffersson U, Lundgren R, Zhang QX, Olsson H. CAG repeat length in the androgen receptor gene is related to age at diagnosis of prostate cancer and response to endocrine therapy, but not to prostate cancer risk. *Br J Cancer.* 1999;81(4):672-6.

Burk O, Tegude H, Koch I, Hustert E, Wolbold R, Glaeser H, Klein K, Fromm MF, Nuessler AK, Neuhaus P, Zanger UM, Eichelbaum M, Wojnowski L. Molecular mechanisms of polymorphic *CYP3A7* expression in adult human liver and intestine. *J Biol Chem.* 2002;5;277(27).

Conover WJ. *Practical nonparametric statistics.* 2a. ed. New York: Wiley. 1980;493p

Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res.* 1994;11;22(15):3181-6.

Cleves MA. Exploratory analysis of single single nucleotide polymorphism (SNP) for quantitative traits. *The Stata Journal.* 2005;5,(2):141-153.

Costa-Barbosa F, Tonetto-Fernandes V, Carvalho V, Nakamura O., Moura V, Bachega TASS, Kater C. Superior discriminating value of ACTH-stimulated serum 21-deoxycortisol in identifying heterozygote carriers for 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol*. 2010;5(1): 143-154.

Dai D, Tang J, Rose R, Hodgson E, Bienstock RJ, Mohrenweiser HW, *et al*. Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;299(3):825-31.

Dasgupta S, Sirisha PV, Neelaveni K, Anuradha K, Reddy AG, Thangaraj K, Reddy BM. Androgen receptor CAG repeat polymorphism and epigenetic influence among the south Indian women with Polycystic Ovary Syndrome. *PLoS One*. 2010;26;5(8):e12401.

Dehm SM, Tindall DJ. Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer. *Mol Endocrinol*. 2007;21(12): 2855-63.

Deligeoroglou E, Kouskouti C, Christopoulos P. The role of genes in the polycystic ovary syndrome: predisposition and mechanisms. *Gynecol Endocrinol*. 2009;25(9):603-9.

Deneux C, Tardy V, *et al*. Phenotype-genotype correlation in 56 women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(1): 207-13.

Desta Z, Soukhova NV, Flockhart DA. Inhibition of cytochrome P450 (CYP450) isoforms by isoniazid: potent inhibition of CYP2C19 and CYP3A." *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(2):382-92.

Dolzan V, Solyom J, *et al*. Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol*. 2005;153(1): 99-106.

El Kassar N, Hetet G, Brière J, Grandchamp B. X-chromosome inactivation in healthy females: incidence of excessive lyonization with age and comparison of assays involving DNA methylation and transcript polymorphisms. *Clin Chem*. 1998; 44: 61–67.

Escobar-Morreale HF, Sanchon R, *et al*. A prospective study of the prevalence of nonclassical congenital adrenal hyperplasia among women presenting with hyperandrogenic symptoms and signs. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(2): 527-33.

Ezquieta B, Cueva E, Varela J, Oliver A, Fernandez J *et al*. Non-classical 21-hydroxylase deficiency in children: association of adrenocorticotrophic hormone-stimulated 17-hydroxyprogesterone with the risk of compound heterozygosity with severe mutations. *Acta Paediatr*. 2002;91: 892-898.

Ferk P, Perme MP, Teran N, Gersak K. Androgen receptor gene (CAG)n polymorphism in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2008;90(3): 860–3.

Fernandez P, De Beer PM, Van der Merwe L, Heyns CF. Genetic variations in androgen metabolism genes and associations with prostate cancer in South African men. *S Afr Med J*. 2010;9;100(11):741-5.

Finkelstein GP, Chen W, Mehta SP, Fujimura FK, Hanna RM, Van Ryzin C, McDonnell NB, Merke DP. Comprehensive Genetic Analysis of 182 Unrelated Families with Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Oct 6. [Epub ahead of print]

Finta C, Zaphiropoulos PG. The human cytochrome P450 3A locus. Gene evolution by capture of downstream exons. *Gene*. 2000;30;260(1-2):13-23.

Gale RE, Wheadon H, Boulos P, Linch DC. Tissue specificity of X-chromosome inactivation patterns. *Blood* 1994; 83: 2899–2905.

Gellner K, Eiselt R, Hustert E, Arnold H, *et al.* Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. *Pharmacogenetics*. 2001;11(2):111-21.

Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol* 2002;20(13): 3001-15.

Gervasini G, Vizcaino S, Gasiba C, Carrillo JA, Benitez J. Differences in CYP3A5*3 genotype distribution and combinations with other polymorphisms between Spaniards and Other Caucasian populations. *Ther Drug Monit* 2005;27(6):819-21.

Giwerzman YL, Nordenskjold A, *et al.* An androgen receptor gene mutation (E653K) in a family with congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency as well as in partial androgen insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(6): 2623-8.

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

Goncalves J, Friaes A, *et al.* Congenital adrenal hyperplasia: focus on the molecular basis of 21-hydroxylase deficiency. *Expert Rev Mol Med*. 2007;9(11): 1-23.

Goodarzi MO, Shah NA, *et al.* Variants in the 5 α -reductase type 1 and type 2 genes are associated with polycystic ovary syndrome and the severity of hirsutism in affected women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(10): 4085-91.

Goodarzi MO, Xu N, Azziz R. Association of CYP3A7*1C and serum dehydroepiandrosterone sulfate levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(7):2909-12.

Guli MR, Wang JQ, Zhang JX, Deng G. Association between the polymorphism of CYP17 gene and risk of prostate cancer in chinese vigurs men. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2006;12(2):120-2.

Hardy DO, Scher HI, Bogenreider T, Sabbatini P, Zhang ZF, Nanus DM, *et al.* Androgen receptor CAG repeat lengths in prostate cancer: correlation with age of onset. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(12):4400-5.

Hickey T, Chandy A, Norman RJ. The androgen receptor CAG repeat polymorphism and X-chromosome inactivation in Australian Caucasian women with infertility related to polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(1):161-5.

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.

Hsing AW, Gao YT, Wu G, Wang X, Deng J, Chen YL, *et al.* "Polymorphic CAG and GGN repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study in China." *Cancer Res.* 2000;15;60(18):5111-6.

Huang N, Agrawal V, Giacomini KM, Miller WL. Genetics of P450 oxidoreductase: sequence variation in 842 individuals of four ethnicities and activities of 15 missense mutations. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;5;105(5):1733-8.

Hughes I. Congenital adrenal hyperplasia: phenotype and genotype. *J Pediatr Endocrinol Metab.* Dec; 2002;15 Suppl 5:1329-40.

Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, *et al.* The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism." *Pharmacogenetics*. 2001;11(9):773-9.

Ibáñez L, Ong KK, Mongan N, Jääskeläinen J, Marcos MV, Hughes IA, De Zegher F, Dunger DB. Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism in the development of ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(7):3333-8.

Ingelman-Sundberg M. Implications of polymorphic cytochrome p450-dependent drug metabolism for drug development. *Drug Metab Dispos*. 2001;29(4 Pt 2): 570-3.

Ingelman-Sundberg M. The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Sep 1;207(2):52-6.

Inoue S, Howgate EM, Rowland-Yeo K, Shimada T, Yamazaki H, Tucker GT, Rostami-Hodjegan A. Prediction of in vivo drug clearance from in vitro data. II: potential inter-ethnic differences. *Xenobiotica*. 2006;36(6):499-513.

Jaffe JM, Malkowicz SB, *et al.* Association of SRD5A2 genotype and pathological characteristics of prostate tumors. *Cancer Res*. 2000;60(6): 1626-30.

Jaaskelainen J, Korhonen S, Voutilainen R, Hippelainen M, Heinonen S. Androgen receptor gene CAG length polymorphism in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2005;83: 1724–1728.

Jeske YWA, McGown IN, Harris M *et al.* 21-Hydroxylase Genotyping in Australasian Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2009;22: 127-141.

Justenhoven C, Hamann U, Pierl CB, Baisch C *et al.* CYP2C19*17 is associated with decreased breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2009;115(2):391-6.

Kang YS, Park SY, Yim CH, Kwak HS, Gajendrarao P, Krishnamoorthy N, *et al.* The CYP3A4*18 genotype in the cytochrome P4503A4 gene, a rapid metabolizer of sex steroids, is associated with low bone mineral density. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;85(3):312-8.

Kashimada K, Ono M, *et al.* Clinical course of patients with nonclassical 21-hydroxylase deficiency (21-OHD) diagnosed in infancy and childhood. *J Endocr.* 2008;55(2): 397-404.

Kirkwood BR, Sterne JAC. *Essential medical statistics.* 2nd ed. Blackwell Science: Massachusetts, USA. 2006; p.502.

Krone N., Arlt W. (2009). "Genetics of congenital adrenal hyperplasia." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 23(2): 181-92.

Krone N, Braun A, *et al.* Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(3):1059-65.

Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, *et al.* Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet.* 2001;27(4):383-91.

Lamba JK, Lin YS, *et al.* Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(10): 1271-94.

Lappalainen S, Utriainen P, Kuulasmaa T, Voutilainen R, Jaaskelainen J. Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism and X-chromosome inactivation in children with premature adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1304-9.

Löfgren S, Michael RB, Hiratsuka M, Lindqvist A, Carlberg A, Sim SC *et al.* Generation of Mice Transgenic for Human *CYP2C18* and *CYP2C19*: Characterization of the Sexually Dimorphic Gene and Enzyme Expression. *Drug Metab. Disposition.* 2008;36(5) 955-962.

Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science.* 1988;15;240(4850):327-30.

Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature.* 1961;22;190:372-3.

Makridakis N, Ross RK, Pike MC, *et al.* A prevalent missense substitution that modulates activity of prostatic steroid 5 α -reductase. *Cancer Res.* 1997;15;57(6):1020-2.

Makridakis NM, Ross RK, *et al.* Association of mis-sense substitution in SRD5A2 gene with prostate cancer in African-American and Hispanic men in Los Angeles, USA. *Lancet.* 1999;354(9183): 975-8.

Merke DP, Bornstein SR. Congenital Adrenal Hyperplasia. *Lancet.* 2005 Jun 18-24;365(9477):2125-36.

Mifsud A, Ramirez S, Yong EL. Androgen receptor gene CAG trinucleotide repeats in anovulatory infertility and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:3484–3488.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;11;16(3):1215.

Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.* 1988;9(3):295-318.

Miller WL. Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology.* 2005;146(6): 2544-50.

Miller WL, Huang N, Pandey AV, Fluck CE, Agrawal V. P450 oxidoreductase deficiency: a new disorder of steroidogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1061:100-8.

Miller WL, Huang N, Agrawal V, Giacomini KM. Genetic variation in human P450 oxidoreductase. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;5;300(1-2):180-4.

Mishra D, Thangaraj K, Mandhani A, Kumar A, Mittal R. Is reduced CAG repeat length in androgen receptor gene associated with risk of prostate cancer in Indian population? *Clin Genet.* 2005;68(1):55-60.

Moran C, Azziz R. 21-hydroxylase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia: the great pretender. *Semin Reprod Med.* 2003;21(3): 295-300.

Nam RK, Toi A, Vesprini D, Ho M, *et al.* V89L polymorphism of type-2, 5-alpha reductase enzyme gene predicts prostate cancer presence and progression. *Urology.* 2001;57(1):199-204.

New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield SE, Pollack MS, Dupont B, Stoner E, Levy DJ, Pang S, Levine LS. Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983;57:320-6.

New MI, White PC, Pang S, Dupont B, Speiser PW. The adrenal hyperplasias. In: Scriver CR, Beaudet AC, Sly WS, Valle D. *The metabolic basis of inherited diseases*, 6a ed. New York, Mc Graw-Hill. 1989; p.1881-1917.

Ogata T, Muroya K, Ishii T, Suzuki Y, Nakada T, Sasagawa I. Undermasculinized genitalia in a boy with an abnormally expanded CAG repeat length in the androgen receptor gene. *Clin Endocrinol*. 2001 Jun;54(6):835-8.

Pang SY, Wallace MA, *et al*. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics*. 1988;81(6): 866-74.

Parajes S, Quinteiro C, *et al*. High frequency of copy number variations and sequence variants at *CYP21A2 locus*: implication for the genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency. *PLoS One*. 2008;3(5): e2138.

Patki KC, Von Moltke LL, and Greenblatt DJ. In vitro metabolism of Midazolam, Triazolam, Nifedipine, and Testosterone by human liver microsomes and recombinant cytochromes P450: Role of CYP3A4 and CYP3A5. *Drug Metab. Dispos*. 2003;31(7):938–944.

Pasqualini T, Alonso G, Tomasini R, *et al*. Congenital adrenal hyperplasia clinical characteristics and genotype in newborn, childhood and adolescence. *Medicina (B Aires)*. 2007;67(3):253-61.

Pegoraro E, Whitaker J, Mowery-Rushton P, Surti U, Lanasa M, Hoffman EP. Familial skewed X inactivation: a molecular trait associated with high spontaneous-abortion rate maps to Xq28. *Am J Hum Genet*. 1997;61(1):160-70.

Penna DJS. Homo Brasilis: aspectos genéticos, lingüísticos, históricos e socioantropológicos da formação do povo brasileiro. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC-RP, 2002.

Perez MS, Cerrone GE, Benencia H, Marquez N, De Piano E, Frechtel GD. Polymorphism in CYP11alpha and CYP17 genes and the etiology of hyperandrogenism in patients with polycystic ovary syndrome. *Medicina (B Aires)*. 2008;68(2):129-34.

Plummer SJ, Conti DV, Paris PL, Curran AP, Casey G, Witte JS. CYP3A4 and CYP3A5 genotypes, haplotypes, and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers*. 2003;12:928–32.

Pusalkar M, Meherji P, Gokral J, Chinnaraj S, Maitra A. (2009). CYP11A1 and CYP17 promoter polymorphisms associate with hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 92(2):653-9.

Quaranta S, Chevalier D, Allorge D, Lo-Guidice JM, Migot-Nabias F, Kenani A, *et al*. Ethnic differences in the distribution of CYP3A5 gene polymorphisms. *Xenobiotica*. 2006;36(12):1191-200.

Reid J, Betney R *et al*. The androgen receptor transactivation domain: the interplay between protein conformation and protein-protein interactions. *Biochem Soc Trans*. 2003;31(Pt 5):1042-6.

Ribeiro ML, Santos A, Carvalho-Salles AB, Hackel C. Allelic frequencies of six polymorphic markers for risk of prostate cancer. *Braz. J. Medical and Biological Research*. 2002;35:205-213.

Rocha RO, Billerbeck AE, Pinto EM, Melo KF, Lin CJ, Longui CA, Bachega TA. The degree of external genitalia virilization in girls with 21-hydroxylase deficiency appears to be influenced by the CAG repeats in the androgen receptor gene. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;68(2):226-32.

Roux S, Morel Y, *et al*. Hirsutism. Two familial cases of 21-hydroxylase deficiency. *Ann Dermatol Venereol*. 1995;122(10): 697-700.

Rodríguez-Antona C, Jande M, Rane A, Ingelman-Sundberg M. Identification and phenotype characterization of two CYP3A haplotypes causing different enzymatic capacity in fetal livers. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;77(4):259-70.

Saroj N, Lin-Su K, New MI. Steroid 21 Hydroxylase Deficiency Congenital Adrenal Hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2009;38(4):699-718.

Scott RR, Gomes LG, Huang N, Van Vliet G, Miller WL. Apparent manifesting heterozygosity in P450 oxidoreductase deficiency and its effect on coexisting 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(6):2318-22.

Shah NA, Antoine HJ, Pall M, Taylor KD, Azziz R, et al. Association of Androgen Receptor CAG Repeat Polymorphism and Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1939-45.

Sharp A, Robinson D, Jacobs P. Age and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum Genet.* 2000;107: 343-9.

Sharp L, Cardy AH, Cotton SC, Little J. CYP17 gene polymorphisms: prevalence and associations with hormone levels and related factors. a *HuGE review.* *Am J Epidemiol.* 2004;15;160(8):729-40.

Shimbo M, Suzuki H, Kamiya N, Imamoto T, Komiya A, Ueda T, Watanabe M, Shiraishi T, Ichikawa T. CAG polymorphic repeat length in androgen receptor gene combined with pretreatment serum testosterone level as prognostic factor in patients with metastatic prostate cancer. *Eur Urol.* 2005;47(4):557-63.

Silva Neto B, Koff WJ, Biolchi V, Brenner C, Biolo KD, Spritzer PM, et al. Polymorphic CAG and GGC repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: analysis of a Brazilian population. *Cancer Invest.* 2008;26(1):74-80.

Silveira EL, Elnecave RH *et al.* Molecular analysis of CYP21A2 can optimize the follow-up of positive results in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Clin Genet.* 2009;76(6): 503-10.

Sim SC, Risinger C, Dahl ML, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L *et al.* A common novel *CYP2C19* gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;79(1):103-13.

Smit P, van Schaik RH, van der Werf M, van den Beld AW, *et al.* A common polymorphism in the CYP3A7 gene is associated with a nearly 50% reduction in serum dehydroepiandrosterone sulfate levels. *J.Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(9):5313-6.

Sobti RC, Gupta L, Thakur H, Seth A, Singh SK, Kaur P. CYP17 gene polymorphism and its association in north Indian prostate cancer patients. *Anticancer Res.* 2009;29(5):1659-63.

Speiser PW, Knochenhauer ES, Dewailly D, Fruzzetti F, Marcondes JA, Azziz R. A multicenter study of women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia: relationship between genotype and phenotype. *Mol Genet Metab.* 2000;71(3):527-34.

Speiser PW, New MI, Tannin GM, Pickering D, Yang SY, White PC. Genotype of Yupik Eskimos with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet.* 1992;88(6):647-8.

Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 2003;349:776-788.

Torres N., Mello M.P., *et al.* (2003). Phenotype and genotype correlation of the microconversion from the *CYP21A1P* to the *CYP21A2* gene in congenital adrenal hyperplasia. *Braz J Med Biol Res.* 36(10): 1311-8.

Trakakis E. Congenital Adrenal Hyperplasia Because of 21-Hydroxylase Deficiency: A Genetic Disorder of Interest to Obstetricians and Gynecologists. *Obst Gynecol Surv.* 2009;64(3): 177-189.

Tusie-Luna MT, Traktman P, White PC. Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. *J Biol Chem.* 1990;5;265(34):20916-22.

Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL. Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(11):3777-82.

Vottero A, Stratakis CA, Ghizzoni L, Longui CA, Karl M, Chrousos GP. Androgen receptor-mediated hypersensitivity to androgens in women with nonhyperandrogenic hirsutism: skewing of X-chromosome inactivation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(3):1091-5.

Weintrob N, Brautbar C, Pertzalan A, Josefsberg Z et al. Genotype-phenotype associations in non-classical steroid 21-hydroxylase deficiency *Eur Jour Endocrinol.* 2000;143(3):397-403.

Williams AJ, Ring BJ, Varon E et al. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7. *Drug Metab. Dispos.* 2002;30(8):883–891.

White PC. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Nat Rev Endocrinol.* 2009;5(9):490-8.

White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev.* 2000;21(3):245-91.

Willrich MA, Hirata MH, Genvigir FD, Arazi SS, Rebecchi IM, Rodrigues AC, *et al.* CYP3A53A allele is associated with reduced lowering-lipid response to atorvastatin in individuals with hypercholesterolemia. *Clin Chim Acta*. 2008;398(1-2):15-20.

Wilson RC, Nimkarn S, *et al.* Ethnic-specific distribution of mutations in 716 patients with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2007;90(4): 414-21.

Witchel SF, Smith R, *et al.* CYP21 mutations in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet*. 2000;106(4): 414-9.

Xie HG, Wood AJ, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics*. 2004;5(3):243-72.

Xita N, Georgiou I, Lazaros L, Psofaki V, Kolios G, *et al.* The role of sex hormone-binding globulin and androgen receptor gene variants in the development of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2008;23: 693–698.

Yamaori S, Yamazaki H, Iwano S, Kiyotani K, Matsumura K, Honda G, *et al.* CYP3A5 Contributes significantly to CYP3A-mediated drug oxidations in liver microsomes from Japanese subjects. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2004;19(2):120-9.

Yamazaki H, Shimada T. Progesterone and Testosterone Hydroxylation by Cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in Human Liver Microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1997;346(1)161-169.

Zouboulis CC, Degitz K. Androgen action on human skin - from basic research to clinical significance. *Exp Dermatol*. 2004;13(4) 5-10.

Zhenhua L, Tsuchiya N, Narita S, Inoue T, Horikawa Y, Kakinuma H, Kato T, Ogawa O, Habuchi T. CYP3A5 gene polymorphism and risk of prostate cancer in a Japanese population. *Cancer Lett.* 2005;225:237-43.

Zhu YS, Sun GH. 5alpha-Reductase Isozymes in the Prostate. *J Med Sci.* 2005;25(1):1-12.