CEZAR NOBORU MATSUZAKI

**Análise dos genes *CYP1A1*, *CYP1B1* e *CYP17* em
meninas com puberdade precoce central**

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

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Edmund Chada
Baracat

SÃO PAULO

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Matsuzaki, Cezar Noboru
Análise dos genes *CYP11A1*, *CYP11B1* e *CYP17* em meninas com puberdade precoce
central / Cezar Noboru Matsuzaki. -- São Paulo, 2013.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientador: Edmund Chada Baracat.

Descritores: 1.Polimorfismo genético 2.Estrogênios 3.Puberdade precoce

USP/FM/DBD-286/13

Dedicatória

Aos meus amados pais **Noboro** e **Hiroko**, pelos ensinamentos, dedicação,
verdadeiros exemplos para minha vida.

À minha amada esposa **Yumi**, pelo amor e companheirismo de sempre.

Ao meus filhos **Bruno** e **Théo**, quem tanto amo e quero ensinar bons
exemplos.

Agradecimentos

A **Deus**, por participar do nosso dia-a-dia.

Ao Prof. Dr. **Edmund Chada Baracat**, pela atenção, apoio e carinho desde o primeiro instante em que nos conhecemos.

Ao Prof. Dr. **José Maria Soares Júnior**, pela amizade, confiança, dedicação e paciência.

Aos amigos do **LIM-58**, Dra. **Kátia Cândido Carvalho**, **Marinalva de Almeida**, **Natália Garcia**, **Rodrigo Rodrigues Marcondes**, **Thiago Hideki Gonçalves** e **Juciara Costa Silva** pela disponibilidade, ajuda, paciência.

Ao Prof. Dr. **Durval Damiani**, por colaborar intensamente neste projeto.

Ao Dr. **José Alcione Macedo Almeida** pelos ensinamentos fundamentais para minha formação na área de Ginecologia da Infância e da Adolescência.

Ao Prof. Dr. **Nilo Bozzini**, por participar da minha formação como profissional e como pessoa desde a Residência Médica.

A todos os **Assistentes** da Disciplina de Ginecologia do HCFMUSP, pelos ensinamentos acadêmico e profissional.

Aos sempre gentis **Funcionários** do Ambulatório e da Secretaria da Ginecologia.

Às **pacientes** que gentilmente aceitaram participar desta pesquisa científica.

Aos meus sogros **Shinichi** e **Saquie**, por participarem tão positivamente de minha vida.

A todos os meus familiares.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	
	1.1 O Hipotálamo e a secreção de GnRH.....	1
	1.2 Puberdade Precoce	7
	1.3 Fatores genéticos associados à puberdade precoce central....	12
2	OBJETIVOS	
	2.1 Objetivo geral.....	21
	2.2 Objetivo específico.....	21
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	
	3.1 Casuística	22
	3.2 Critérios de elegibilidade.....	22
	3.2.1 Critérios de inclusão.....	22
	3.2.2 Critérios de exclusão.....	23
	3.2.3 Seleção.....	23
	3.3 Métodos.....	23
	3.3.1 Exames laboratoriais.....	23
	3.3.2 Coleta e processamento do material biológico.....	24
	3.3.3 Análise Estatística.....	26
4	RESULTADOS	
	4.1 Dados clínicos.....	27
	4.2 Genotipagem.....	28
5	DISCUSSÃO.....	32
6	CONCLUSÕES.....	38
7	ANEXOS.....	39
8	REFERÊNCIAS.....	50

Lista de Abreviaturas

Lista de Abreviaturas

AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
C	Citosina (base nitrogenada)
CI	Intervalo de confiança
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
E ₂	17β-estradiol
ERβ	Receptor de estrogênio do tipo β
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FSH	Hormônio folículo-estimulante
G	Guanina (base nitrogenada)
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GABRA 1	Receptor α1 ácido γ-aminobutírico
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GPR54	Receptor 54 ligado a proteína G
HE	Hidroxi-estradiol
HHO	Hipotálamo-hipófise-ovariano
IFMA	Método imunofluorométrico
LH	Hormônio luteinizante
mcg	microgramas
NMDAR	Receptores N-metil-D-aspartato
NPY	Neuropeptídeo Y
OR	Odds ratio (razão de chances)
pb	Pares de bases
PP	Puberdade precoce
SNC	Sistema nervoso central
T	Timina (base nitrogenada)
TGF-α	Fator de crescimento tumoral α
UI/L	Unidades internacionais por litro

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Tabela 1	Oligonucleotídeos para as reações de PCR.....	25
Tabela 2	Dados clínicos das pacientes participantes do estudo	27
Tabela 3	Resultados da genotipagem nos dois grupos estudados.....	31

Lista de Figuras

Lista de Figuras

Figura 1	Enzimas envolvidas no metabolismo do estradiol (adaptado de Blair, 2010).....	17
Figura 2	Biossíntese do estradiol (adaptado de Blair, 2010).....	18
Figura 3	Gel representativo do padrão de polimorfismo obtido na restrição com <i>MspI</i> de amostras amplificadas para <i>CYP1A1</i> . P, padrão de peso molecular de 100 pares de base. Amostras com uma única banda indicam perfil selvagem (~340 pb, linhas 12-14), enquanto as amostras com duas (~210 e ~130pb, linha 37) e três bandas (~340, ~210 e ~130pb, linhas 4-6) indicam o perfil homozigoto e heterozigoto para a mutação. As setas indicam a migração do padrão de peso molecular em 500pb.....	29
Figura 4	Gel representativo do padrão de polimorfismo obtido na restrição com <i>Eco 571</i> de amostras amplificadas para <i>CYP1B1</i> . P, padrão de peso molecular de 100 pares de base. Amostras com uma única banda indicam perfil selvagem (G/G, linhas 19-21), enquanto as amostras com três bandas (G/C, linhas 29-31) e duas bandas (C/C, linhas 61-64) indicam o perfil heterozigoto e homozigoto para a mutação, respectivamente. As setas indicam a altura aproximada de migração dos três fragmentos obtidos.....	30
Figura 5	Gel representativo do padrão de polimorfismo obtido na restrição com <i>Msp1A</i> de amostras amplificadas para <i>CYP17</i> . P, padrão de peso molecular de 100 pares de base. Amostras com uma única banda indicam perfil selvagem (A1/A1, linhas 13-17), enquanto as amostras com três bandas (A1/A2, linhas 26-39) indicam o perfil heterozigoto. As setas indicam a altura aproximada de migração dos três fragmentos obtidos.....	30

Resumo

Matsuzaki, CN. *Análise dos genes CYP1A1, CYP1B1 e CYP17 em meninas com puberdade precoce central*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: Os fatores genéticos que influenciam o início da puberdade precoce ainda não são totalmente conhecidos. Assim, investigar os mecanismos gênicos que estariam envolvidos na sua gênese é muito importante, pois, além de possibilitar o diagnóstico em fases iniciais, pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias, com melhora do prognóstico. Para alguns investigadores, o estradiol também seria um fator contribuinte no determinismo da puberdade. **OBJETIVOS:** Estudar três genes que codificam enzimas relacionadas à esteroidogênese (*CYP1A1*, *CYP1B1* e *CYP17*) em meninas com puberdade precoce central. Avaliar a associação entre variações na sequência desses genes e a puberdade precoce central. **MÉTODOS:** Foram incluídas 177 pacientes, divididas em dois grupos: Grupo Controle - formado por 104 meninas sem puberdade precoce, acompanhadas no Setor de Ginecologia da Infância e da Adolescência da Divisão de Clínica Ginecológica do HC-FMUSP por outros diagnósticos; Grupo Caso - composto por 73 meninas com diagnóstico de puberdade precoce central, acompanhadas no mesmo setor. Foi avaliada a presença de mutação em genes envolvidos no metabolismo do estrogênio (*CYP1A1*, *CYP1B1* e *CYP17*) pela técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), utilizando DNA obtido a partir de sangue periférico. **RESULTADOS:** A distribuição dos genótipos de *CYP1A1* MspI ($p=0,86$) e *CYP17* ($p=0,12$) não apresentou diferença significativa entre os grupos. Para o *CYP1B1* Eco571, o genótipo mutado C/C foi mais frequente no Grupo Controle que no Grupo Caso ($p=0,03$). **CONCLUSÃO:** Nossos dados sugerem que a variação do gene *CYP1B1* Eco571 poderia estar associada ao determinismo da puberdade.

DESCRITORES: Polimorfismo genético; Estrogênios; Puberdade precoce

Abstract

Matsuzaki, CN. *Analysis of the CYP1A1, CYP1B1, and CYP17 genes in girls with central precocious puberty*. São Paulo: School of Medicine, University of São Paulo; 2013.

INTRODUCTION: The genetic factors influencing onset of precocious puberty are not as yet fully known. Therefore, it is very important to investigate the genetic mechanisms involved in its genesis, for the resulting knowledge would not only enable diagnosis in the early stages but also contribute to the development of new therapies for improvement in prognosis. According to some researchers, estradiol would also be a contributory factor in puberty timing. **OBJECTIVES:** To investigate three genes which codify enzymes associated with steroidogenesis (*CYP1A1*, *CYP1B1*, and *CYP17*) in girls with central precocious puberty by focusing on the association between the sequence variation of these genes and central precocious puberty. **METHODS:** A total of 177 patients was included and divided into two groups: Control Group with 104 girls without precocious puberty who were being treated for other diagnoses at the Sector of Gynecology of Childhood and Adolescence, Division of Gynecology Clinic, HC-FMUSP; Case Group with 73 girls diagnosed with central precocious puberty. Mutations in genes involved in estrogen metabolism (*CYP1A1*, *CYP1B1*, and *CYP17*) were assessed by the RFLP (restriction fragment length polymorphism) technique using DNA obtained from peripheral blood. **RESULTS:** No significant difference in the distribution of the *CYP1A1* MspI ($p=0.86$) and *CYP17* ($p=0.12$) genotypes was detected between the two study groups. As for *CYP1B1* Eco571, the mutated C/C genotype was found to be more frequent in the Control Group than in the Case Group ($p=0.03$). **CONCLUSION:** Our data suggest the *CYP1B1* Eco571 gene variation is associated with puberty timing.

KEYWORDS: Genetic polymorphism, Estrogens, Precocious puberty

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Hipotálamo e a secreção de GnRH

O hipotálamo é a parte do diencefalo na base do cérebro que forma a base e parte da parede do III ventrículo. É composto por neurônios que secretam hormônios glicoproteicos, que são responsáveis pela regulação da atividade de outros neurônios no hipotálamo (efeito parácrino) ou em outros órgãos ou tecidos, como a hipófise (efeito endócrino), com ação estimulatória ou inibitória. Além disso, compartilham as características tanto de células neuronais quanto endócrinas. Especificamente no sistema reprodutor, os neurônios que produzem o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) são os mais importantes para o eixo hipotálamo-hipófise-ovário. Estas células se originam da área olfatória, mas são encontradas, em grande quantidade, no núcleo arqueado do hipotálamo, que é considerado o centro responsável pelo ritmo de produção e de liberação do GnRH. Portanto, alguns autores denominam esta área de gonadostato (Speroff e Fritz, 2011).

A puberdade se inicia quando estímulos excitatórios da comunicação neurônio-célula glial aumentam sobre a rede de neurônios GnRH e o tônus inibitório transsináptico diminui, levando a ativação da secreção pulsátil de GnRH (Ojeda et al., 2006). Portanto, existem inúmeras interações com outros neurônios, neurotransmissores, esteroides sexuais, indolaminas e fatores de crescimento que modulam a liberação de GnRH pelos neurônios GnRH (Schwanzel-Fukuda, 1989).

Em 1971, Matsuo desvendou a estrutura molecular do GnRH, descrevendo-o como um decapeptídeo. Este hormônio se liga aos receptores de membrana presentes nas células da adeno-hipófise, ativando a adenilciclase. Há, conseqüentemente, maior formação de AMP cíclico (AMPc) a partir de ATP intracelular, o que estimula o aumento de retenção de cálcio. Ainda, ocorre a ativação da proteína quinase C, resultando em síntese, armazenamento e secreção dos hormônios gonadotróficos: luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH). Desta forma, o GnRH é responsável por regular indiretamente a atividade gonadal por meio de estímulos da secreção destes hormônios hipofisários (Speroff e Fritz, 2011).

Outro aspecto é a frequência e amplitude dos pulsos de GnRH, bem como dos hormônios gonadotróficos, que são importantes para o controle da atividade ovariana, crescimento folicular, postura ovular e formação do corpo lúteo e, conseqüentemente, da manutenção da função reprodutiva. Salienta-se ainda que ocorrem oscilações intensas na frequência e na amplitude dos pulsos destes hormônios durante o ciclo menstrual por influência dos esteróides sexuais, como o estrogênio e a progesterona (Schwanzel-Fukuda, 1989).

O núcleo arqueado é o sítio central da liberação pulsátil do GnRH para as veias portais da hipófise. Nos gonadotrofos, o GnRH estimula a síntese de seus receptores quando secretado de forma pulsátil, elevando a quantidade de receptores ("up regulation"). Fatores ou hormônios que levam à redução da frequência de pulsos de GnRH determinam menor sensibilidade dos gonadotrofos, comprometendo a função reprodutiva. Contudo, a exposição contínua da hipófise ao GnRH resulta, após estimulação inicial, em dessensibilização secundária

hipofisária (“down regulation”), levando à redução principalmente da produção e da secreção de LH. Este é o mecanismo que os agonistas do GnRH determinam o repouso hipofisário, ou seja, o estímulo acentuado e contínuo leva à degradação dos receptores de GnRH, sem haver uma compensatória reposição destes na membrana celular. Por isto, a oscilação dos pulsos de GnRH é importante para o adequado funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano (HHO) (Grumbach, 2002).

Deve-se, ainda, citar que a conversão do estímulo elétrico do córtex encefálico pode influenciar na regulação dos neurônios GnRH. Esta interação foi constatada após experimentos que mostraram aumento na secreção de GnRH após estimulação elétrica da região pré-óptica ou do hipotálamo anterior. Em contrapartida, o bloqueio de impulsos adrenérgicos ou o aumento da atividade dopaminérgica inibem a secreção de GnRH. Portanto, alterações do sistema nervoso central também podem interferir na regulação do eixo HHO, resultando em puberdade precoce ou tardia. Assim, alterações psíquicas e/ou neurológicas podem ter grande impacto no sistema reprodutor (Speroff e Fritz, 2011).

Além das interações de neurônios, há controles por retroalimentação, que pode ser positiva (estimulatória) e negativa (inibitória) (Schwanzel-Fukuda e Pfaff, 1989).

As principais substâncias ou neurotransmissores que controlam o GnRH são: glutamato, dopamina, norepinefrina, endorfina, serotonina e melatonina. A dopamina é a precursora imediata da norepinefrina e da epinefrina, mas por si só funciona como um neurotransmissor agindo no hipotálamo e também regulando a hipófise (Ben-Jonathan e Hnasko, 2001).

O Glutamato é um dos principais neurotransmissores envolvidos no sistema neuronal estimulatório da maturação sexual agindo através dos seus receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR) estimulando a secreção de GnRH (Ottem et al., 2002).

Na eminência média, tanto células astrogliais quanto ependymogliais modificadas conhecidas como tanicitos têm íntima relação com neurônios GnRH. O TGF- α se liga ao seu receptor erbB1 localizado nos astrócitos e tanicitos levando a maior secreção de mensageiros químicos como as Prostaglandinas E2 que estimulam a secreção de GnRH (Ojeda et al., 2006).

As células responsáveis pela síntese de dopamina podem ser encontradas nos núcleos arqueado e paraventricular. A administração de dopamina por infusão intravenosa está associada à supressão dos níveis circulantes de prolactina e de gonadotrofinas. A dopamina não exerce efeito direto na secreção de gonadotrofinas pela hipófise anterior. Seu efeito é mediado pela inibição da liberação de GnRH no hipotálamo. Outro mecanismo de ação desta catecolamina no sistema reprodutor é a de regular a liberação de prolactina na adeno-hipófise (Andersen et al., 1987; Speroff e Fritz, 2011).

A maioria dos corpos celulares que sintetizam norepinefrina está localizada no mesencéfalo e no tronco cerebral inferior. A norepinefrina exerce efeitos estimulatórios na liberação de GnRH, enquanto a dopamina e a serotonina efeitos inibitórios (Herbison, 1997).

Nos últimos anos, as kisspeptinas têm chamado atenção dos pesquisadores por influenciarem o sistema reprodutor. Constituem peptídeos codificados pelo gene *KISS1*, que foram identificados pela primeira vez por Lee et

al. (1996). Ligam-se à proteína G acoplada ao receptor 54 (GPR54), que está localizada na superfície dos neurônios GnRH, exercendo papel importante no controle da liberação de GnRH e no início da puberdade (Messenger et al., 2005; Shahab et al., 2005; Keen et al., 2008).

Com o descobrimento da kisspeptina (anteriormente conhecida como metastina), os investigadores achavam que sua ação seria predominante no processo de metástase, visto que o gene *KISS1* foi originalmente identificado como supressor de metástase humana, com capacidade de suprimir o crescimento do melanoma e das metástases do câncer de mama. Recentemente, ficou claro que a sinalização do complexo kisspeptina-GPR54 exerce importante papel no incremento da secreção do GnRH, podendo ser muito relevante para o início da puberdade (Dungan et al., 2006).

Na puberdade, a atividade do eixo HHO começa com o aumento da frequência de liberação de GnRH, de forma progressiva, passando do padrão de inatividade, com ativação mais evidente noturna, até alcançar o padrão completamente ativo, como ocorre durante a menarca. Neste processo há o desenvolvimento puberal, que culmina com a menarca. Com o término da puberdade, a secreção pulsátil se mantém durante o período de 24h, mas varia tanto na amplitude quanto na frequência. As mudanças progressivas na secreção de FSH e LH, principalmente as deste último, refletem a ativação da secreção pulsátil de GnRH. A liberação de hormônios ovarianos também é pulsátil, coordenada pelos hormônios gonadotróficos, que estimulam a esteroidogênese ovariana (Backstrom et al., 1982; Marshall et al., 1991). O LH estimula as células

da teca interna a sintetizar os precursores androgênicos. O FSH aumenta a síntese de aromatase, que converte esses precursores em estrogênio.

Deve-se, ainda, mencionar que durante o ciclo menstrual, após a menarca, também ocorrem adaptações do eixo HHO. Assim, a secreção pulsátil de GnRH é mais frequente e com maior amplitude durante a fase folicular em comparação com a fase lútea. A baixa frequência de secreção na fase lútea tardia representa importante mudança, favorecendo a síntese e secreção de FSH, o que permite a elevação deste hormônio no próximo ciclo (McCartney et al., 2002).

A regularidade do ciclo menstrual depende da adequada liberação de GnRH com determinado padrão de frequência e amplitude, bem como da harmonia com a hipófise e com a função ovariana. A atividade pulsátil e rítmica depende de propriedade intrínseca dos neurônios GnRH, que sofre ação modeladora dos neurotransmissores já citados, assim como de hormônios. (Stojilkovic et al., 1994).

Dentre esses hormônios, o estradiol (estrogênio mais ativo) é secretado pelo ovário após estímulo das gonadotrofinas. Existe também a fonte de estrogênio através da conversão periférica, nos fibroblastos do tecido gorduroso (Speroff e Fritz, 2011). O estradiol, pela retroalimentação, regula tanto a secreção de GnRH quanto a resposta hipofisária a este hormônio, mas os mecanismos celulares ainda são desconhecidos (Moenter et al., 2003). Ele pode alterar a condutância dos neurônios GnRH influenciando na amplitude, no tempo de decaimento, e na voltagem depende da corrente de potássio tipo A, apresentando ações tanto negativas quanto positivas na liberação de GnRH. Quando os níveis de estradiol aumentam dos níveis basais iniciais para a fase folicular tardia, há

uma resposta bifásica em termos de liberação de GnRH (Moenter et al., 2003). Inicialmente, a amplitude do pulso e algumas vezes sua frequência são suprimidas (retroalimentação negativa). Várias horas depois, há um aumento massivo da liberação de GnRH, que eleva continuamente os níveis na circulação portal. Portanto, alterações na produção ou na ação do estrogênio podem também modificar a pulsatilidade do GnRH.

1.2 Puberdade Precoce

A puberdade é marcada pelo estirão do crescimento e pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários (Carel et al., 2004). Estes últimos podem ser identificados clinicamente pelos critérios de Marshall e Tanner (Marshall 1969). Em meninas, inicia-se com a aceleração do crescimento (estirão do crescimento) e desenvolvimento do botão mamário ou telarca (M2 de Tanner), que acontece entre oito e treze anos de idade (Damiani, 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde e nos países europeus (Teilmann et al., 2005), quando este processo de desenvolvimento puberal começa antes dos oito anos de idade nas meninas é considerado como puberdade precoce (PP). Este conceito é aceito pela maioria dos investigadores (Papathanasiou e Hadjiathanasiou, 2006). Sua incidência é cerca de 20/10.000 meninas nesta faixa etária (Teilmann et al., 2005).

A PP pode ser dividida em: incompleta (telarca, pubarca ou menarca isoladas) e completa. Esta última pode ser: a) central ou verdadeira (dependente

do GnRH) e b) periférica ou pseudo-PP (independente do GnRH) (Papathanasiou e Hadjiathanasiou, 2006).

A forma completa de PP decorre em 98% e 2%, respectivamente, de causa central e periférica. Na PP central, ocorre o aparecimento das características puberais secundárias à ativação do eixo HHO, com elevação das gonadotrofinas (FSH e LH). A PP central ocorre mais frequentemente em meninas que meninos (aproximadamente 20:1) e cerca de 90% dos casos femininos são idiopáticos (sem causa definida) ou constitucionais (herança familiar) (Chemaitilly et al., 2001; Teilmann et al., 2005; Brito et al., 2008).

A PP periférica é causada por excesso de hormônios sexuais (estrogênios ou androgênios) obtidos a partir de fonte exógena, secreção pelas gônadas ou nas glândulas supra-renais, sem ativação do eixo HHO (Brito, 1999).

A avaliação de uma paciente com suspeita de PP inicia-se com anamnese e exame físico geral e ginecológico detalhados, seguido de avaliação da maturação esquelética (idade óssea). Procura-se caracterizar a etiologia (central ou periférica), evidenciar o estágio da puberdade para avaliação do prognóstico da estatura definitiva e definir a melhor conduta terapêutica. Salienta-se que o diagnóstico é eminentemente clínico.

A avaliação da idade óssea é realizada através de uma radiografia de mãos e punhos, pelo método de Greulich-Pyle (Greulich e Pyle, 1959).

Para definirmos a PP como sendo de origem central deve-se caracterizar a ativação do eixo HHO. Isso é possível pelos exames hormonais. Em relação à dosagem dos níveis basais de gonadotrofinas, valores de LH superiores a 0,6UI/L, dosados pelo método imunofluorométrico (IFMA), indicam haver estimulação do

eixo HHO. Embora este seja parâmetro melhor na avaliação da PP central em relação à dosagem de FSH, sua sensibilidade é de 62,7%, com especificidade de 100% (Damiani, 2002).

Para os casos em que o diagnóstico de ativação do eixo HHO não tenha sido identificado pela dosagem basal de LH, faz-se necessário o teste de estímulo com GnRH. Consiste na administração de 100mcg de GnRH endovenoso, sendo a dosagem de LH realizada nos tempos 0 e 30, 45 e 60 min após o estímulo. O pico de LH é atingido por volta de 15 a 20 min após o estímulo. Níveis de LH superiores a 6,9UI/L (pelo método IFMA) são indicativos de estimulação do eixo HHO. Este exame apresenta sensibilidade de 92,2% e especificidade de 100% para o diagnóstico de PP central (Brito et al., 1999).

Alguns autores ainda sugerem excluirmos as causas de PP periférica para termos a certeza que se trata de PP central (Soriano-Guillén e Argente, 2012). Embora represente a grande maioria dos casos, a puberdade precoce central idiopática é um diagnóstico de exclusão. O exame de campo visual e de fundo de olho devem ser realizados para avaliar se há comprometimento do SNC, além de um exame dermatológico minucioso (pesquisa de manchas cutâneas café-com-leite). A ressonância magnética de crânio pode ser utilizada para identificar lesões de SNC (Carel et al., 2009).

Com a PP há o estímulo precoce pelos esteróides sexuais, principalmente do estrogênio, levando a aceleração da maturação óssea e maior risco de não atingir seu potencial genético de crescimento, resultando em estatura final mais baixa (Brito et al., 2008). Este fato pode causar distúrbio psicossocial, além de maior risco de abuso sexual, de gestação precoce, bem como de doenças

estrogênio-dependentes, como endometriose, leiomioma e câncer mamário (Longui et al., 2001).

O tratamento clássico consiste no bloqueio do eixo HHO com análogos do GnRH (Klein et al., 2001), que irá determinar redução dos receptores de GnRH na hipófise, levando à queda acentuada da produção e liberação dos hormônios gonadotróficos e diminuição da função ovariana. Apesar das diferentes vias de administração, dosagem e duração de ação, todos os análogos são eficientes quando o tratamento é iniciado precocemente (Antoniazzi e Zamboni, 2004).

Além da estatura final, o tratamento tem como objetivo evitar as consequências psicológicas da PP, incluindo o risco para distúrbios emocionais e alterações comportamentais, além da ansiedade dos pais dessas meninas (Heger et al., 2005).

O diagnóstico e o tratamento precoce da PP são essenciais para o prognóstico do bem estar geral da paciente. Porém, as causas da PP ainda não estão elucidadas. O determinismo da puberdade parece envolver diferentes mecanismos que dependem da suscetibilidade genética de cada indivíduo, junto com a interação de fatores ambientais que determinam mudanças hormonais importantes que serão necessárias para o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários (Krstevska-Konstantinova et al., 2001).

Dentre os fatores que podem interferir no determinismo da puberdade, podemos citar os disruptores endócrinos que são substâncias disseminadas no ambiente e que, no organismo, influenciam no sistema endócrino. Por exemplo, em crianças que migraram para Bélgica e apresentam alta incidência de puberdade precoce foi feita a detecção sérica de 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)

etileno (um persistente derivado do pesticida organoclorado DDT – Diclorodifeniltricloroetano), banido dos EUA e dos países europeus, mas ainda utilizados nos países em desenvolvimento.

O DDT, que tem efeito agonista do estrogênio, promove uma maturação do hipotálamo e exerce uma ação inibitória na hipófise mais evidente nas meninas pré-púberes. Com a migração, a exposição a esta substância é interrompida, com quebra do retrocontrole negativo sobre a hipófise e liberação do eixo (Krstevska-Konstantinova et al., 2001). Porém, os investigadores questionam o papel isolado dos fatores ambientais, sugerindo que o principal determinante do momento do início da puberdade parece ser o genético. Estudos com gêmeos mostraram haver maior concordância da idade óssea, idade da menarca, estirão de crescimento e do desenvolvimento puberal entre gêmeos monozigóticos em relação aos dizigóticos (Parent et al., 2003).

Os fatores genéticos que influenciam o determinismo da puberdade ainda não são totalmente conhecidos (Jarzabek-Bielecka et al., 2011). Segundo relatos de Vries et al, a prevalência de puberdade precoce relacionada a componente genético familiar com transmissão autossômica dominante seria de 27,5% (de Vries et al., 2004). Contudo, podem existir outros genes também envolvidos (Ojeda et al., 2006).

Assim, a investigação dos mecanismos gênicos que estariam envolvidos na gênese da PP seria muito importante, pois, além de possibilitar o diagnóstico através da descoberta de marcadores genéticos, poderia contribuir para o desenvolvimento de novas terapias, com melhora do prognóstico.

1.3 Fatores genéticos associados à puberdade precoce central

O controle neuroendócrino da puberdade não depende apenas de um gene, mas de uma complexa interação entre muitos genes que se relacionam em arranjos hierárquicos diversos, influenciando na rede regulatória hormonal e interconectada aos neurônios no sistema nervoso central que irão liberar o GnRH (Ojeda et al., 2006).

Podemos citar os genes relacionados ao sistema GPR54 / Kisspeptina. O gene *KISS1* codifica a kisspeptina, que atua via receptor GPR54. A expressão da kisspeptina é maior nos núcleos arqueado e paraventricular, que se projetam para a área pré-óptica medial. Esta área contém uma abundância em neurônios GnRH que expressam o GPR54 na superfície (Smith e Clarke, 2007). A partir de 2003, a kisspeptina foi associada à função reprodutiva (de Roux et al., 2003). Estudos demonstraram que sua ligação com o GPR54 na membrana de neurônios GnRH hipotalâmicos exerceria potente estímulo na secreção de GnRH (Navarro et al., 2007). Teles e Bianco em 2008 identificaram a mutação Arg386Pro GPR54, autossômica dominante, a qual prolongaria a sinalização intracelular do GPR54 ativado pela kisspeptina, que estaria relacionada à puberdade precoce central.

O Glutamato é um dos principais neurotransmissores envolvidos no sistema neuronal estimulatório da maturação sexual (Ottem et al., 2002). A neurotransmissão do glutamato é um processo complexo controlado por uma gama de genes envolvidos na síntese, transporte e liberação deste aminoácido, assim como a expressão de vários receptores que mediam sua ação (Ojeda et al., 2006).

O Neuropeptídeo Y (NPY) é um dos fatores responsáveis pela inibição da secreção pulsátil de GnRH durante a fase pré-puberal em primatas não humanos (Plant e Barker-Gibb, 2004). Sua secreção e a expressão gênica em neurônios hipotalâmicos são reguladas pelos esteróides sexuais (Sahu et al., 1992). Após o desenvolvimento puberal, o neuropeptídeo Y estimula a liberação de GnRH (Pau et al., 1995). Na ausência de estrogênio, inibe a secreção de gonadotrofinas. Como a desnutrição está associada a um aumento de NPY em mulheres com anorexia e bulimia nervosa, o NPY é visto como um elo de ligação entre nutrição e a função reprodutiva (McShane et al., 1992). Age pela ação em seis diferentes subtipos de receptores. Destes, o subtipo Y1, um inibidor do GPR (G protein-coupled receptor), é o mais relacionado ao efeito do NPY na secreção de GnRH; contudo, os polimorfismos deste gene não confirmaram haver correlação com puberdade precoce (Balasubramaniam, 2002 e Freitas et al., 2006).

Outro alvo seria o gene que codifica o ácido γ -aminobutírico (GABA), neurotransmissor inibitório dos neurônios GnRH hipotalâmicos. Atua através do seu receptor GABRA 1 (γ -Aminobutyric acid-A Receptor α 1-subunit). Entretanto, os resultados preliminares não mostraram associação entre o polimorfismo deste gene e a PP (Brito et al., 2006).

Os genes que codificam a melatonina e seus receptores também podem estar relacionados com a PP. O efeito da melatonina no amadurecimento sexual apresenta um processo biológico de transição do estado sexual imaturo para o maduro. Isto deve-se à reativação do eixo HHO, que acha-se suprimido durante a

infância (Maganhin et al., 2008). Contudo, há controvérsias se apenas a redução de melatonina seria o desencadeante da puberdade (Molina-Carballo et al., 2007).

Atualmente, vários investigadores intensificaram sua atenção para os distúrbios relacionados com o desenvolvimento puberal que podem ter impacto psicoeconomicossocial durante a idade adulta (Loomba-Albrecht e Styne, 2012). Porém, os fatores genéticos que influenciam o início da puberdade ainda não são totalmente conhecidos (Jarzabek-Bielecka et al., 2011).

A maioria dos estudos que avalia a influência dos fatores genéticos no determinismo da PP correlacionam fatores centrais, relacionados aos neurotransmissores. Existem poucos estudos avaliando fatores periféricos que podem influenciar na ativação precoce do eixo HHO. O Estradiol administrado em ratas fêmeas imaturas com 5 a 10 dias de vida levou a uma secreção pulsátil de GnRH típica do processo de maturação hipotalâmica levando a um quadro de puberdade precoce (Rasier et al., 2005).

Para alguns investigadores, o estradiol talvez não fosse consequência do início do processo de puberdade, mas poderia ser também um fator contribuinte no amadurecimento do eixo HHO (Gorai et al., 2003; Moenter et al., 2003; Ronnekleiv et al., 2012). Em alguns genes candidatos, como os que controlam a biossíntese, ação e metabolismo dos esteroides sexuais foram encontrados polimorfismos associados a variações no determinismo da puberdade em uma dada população como sugerido por Parent et al. (2005).

O 17β -estradiol (E_2) regula a atividade do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) por mecanismos tanto pré quanto pós-sinápticos. De fato, o E_2 tem ação significativa na modulação da expressão de RNA mensageiro de

numerosos canais iônicos nos neurônios GnRH, que aumentariam a condutância intracelular como canais de potássio (KATP, tipo A) e de cálcio de baixa voltagem tipo T e alta voltagem tipo L. Estes são importantes para a atividade intracelular do neurônio GnRH, resultando em aumento da produção hormonal. Contudo, este processo é dose dependente, ou seja, varia conforme a concentração sérica de estrogênio. Além disso, é bem documentado que o E_2 pode alterar a excitabilidade dos neurônios GnRH por ação direta em seu receptor, mas a cascata de sinalização intracelular por esta via ainda não é bem compreendida no ser humano (Ronnekleiv et al., 2010).

Em modelos animais, o estrogênio age diferentemente conforme o núcleo hipotalâmico. Por exemplo, a retroalimentação é positiva no núcleo paraventricular e negativa quando a ação ocorre no núcleo arqueado (Clarkson et al., 2008; Gottsch et al., 2009).

Possível explicação seria o número de receptor e proteína estimulatória que são expressas diferentemente em cada região. Portanto, alteração na ação do receptor poderia alterar a regulação da liberação do GnRH. Além disso, estudos sugerem rápida e direta ação excitatória dos neurônios GnRH pelo E_2 agindo nos seus receptores do tipo β ($ER\beta$) (Ronnekleiv et al., 2010). Este fato sugere que a ação direta do estrogênio seria importante para regulação do GnRH.

Outro ponto importante é que o E_2 pode também influenciar a atividade do seu receptor. Portanto, alterações gênicas que alterem este metabolismo poderiam agir também na hipófise. Células da hipófise de ratas pré-incubadas com estradiol e 4-hidroxiestradiol produzem padrão de secreção de LH significativamente maior quando estimuladas pelo GnRH do que células sem essa

pré-incubação. Assim, se a alteração gênica determinar mudança no padrão de metabolização do estrogênio, isto poderia influenciar o eixo HHO (Emons et al., 1986).

Entre os genes que podem estar associados à puberdade precoce, estão aqueles relacionados às enzimas que participam da esteroidogênese. O citocromo P450-1A1 (*CYP1A1*) é a enzima que participa do processo de hidroxilação do estrogênio, levando à formação dos seus metabólitos hidroxiestradiol (HE_2), como o 4- HE_2 e o 16 α - HE_2 , com atividade hormonal muito potente (Huang et al., 1999) (Figura 1).

Figura 2 - Biossíntese do estradiol (adaptado de Blair, 2010).

O polimorfismo do *CYP1A1*, *CYP1B1* e *CYP17* estão relacionados com o aumento da biossíntese de estradiol e elevação de seu nível sérico e de sua potência hormonal. O nível sérico e a potência hormonal do estrogênio estão relacionados ao feed-back positivo, estimulando a produção e secreção de GnRH no meio do ciclo menstrual (Ronnekleiv et al., 2010).

A região 5'- não traduzida do *CYP17* apresenta um polimorfismo com a troca de timina (T) por citosina (C) que cria sítio de restrição Msp1A, identificando-se dois alelos, A1 (normal ou selvagem) e A2 (mutado). Este último aumenta a expressão do *CYP17*, incrementando a biossíntese de estradiol. De fato, a concentração sérica do E₂ aumenta muito na fase proliferativa do ciclo menstrual nas mulheres com esse polimorfismo. Assim, Feigelson et al. (1999) encontraram elevação de aproximadamente 10% e 60%, respectivamente, em mulheres heterozigotas (A1/A2) e homozigotas (A2/A2) ao polimorfismo em comparação com as mulheres normais sem esta alteração genética, no 11º dia do ciclo menstrual. Além disso, mostraram que as mulheres homozigotas para o alelo A2 na pós-menopausa teriam maior disponibilidade hormonal, bem como maior risco para câncer mamário (Feigelson et al., 1999). O polimorfismo A2 do *CYP17* foi relacionado a menarca precoce em meninas japonesas (Gorai et al., 2003).

O gene *CYP11B1* localiza-se no cromossomo 2p21-p22 e contém três exons. A substituição de uma base guanina (G) por C no exon 3 resulta na troca de valina por leucina no códon 432 criando um sítio de restrição Eco 571 que permite a identificação dos genótipos G/G (homozigoto selvagem), G/C (heterozigoto), C/C (homozigoto mutado) (Zheng et al., 2000). Sabe-se que um dos fatores de risco para o câncer de mama é a menarca precoce, pois aumentaria a disponibilidade estrogênica. Reforçando a ação do polimorfismo deste gene, Zheng et al. (2000) avaliaram 186 pacientes com câncer de mama e 200 pacientes controle, sem esse câncer. Encontraram risco maior de câncer em mulheres com este polimorfismo, com OR de 2,3 (95% CI, 1,2 – 4,3). Outro polimorfismo que pode também predispor ao câncer mamário é o *CYP11A1*,

decorrente da substituição de C por T na região não codificante 3', a qual cria um sítio de restrição MspI que permite a identificação dos genótipos CYP1A1wt/wt, CYP1A1wt/vt, CYP1A1vt/vt. O alelo homozigoto CYP1A1vt/vt, que contém o polimorfismo, foi associado a maior risco para câncer de mama em mulheres na pós-menopausa, com OR de 3,0 (95% CI, 1,03 – 8,89) (Huang et al., 1999). Com estes polimorfismos, ainda não há dados na literatura comprovando sua relação com o determinismo da puberdade precoce.

Apesar da PP estar associada a maior risco de doenças estrogênio-dependentes, como o câncer de mama e outras afecções dependentes do estrogênio, ainda constitui um enigma para os clínicos (Huang et al., 1999; Zheng et al., 2000). Portanto, o estudo das alterações gênicas envolvidas no início deste processo é de suma importância para aumentar o conhecimento dos mecanismos envolvidos no controle desta afecção. Possivelmente poderemos encontrar genes candidatos a biomarcadores e, com isso, propor novos tratamentos.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Estudar as alterações de três genes relacionados com o determinismo da puberdade em meninas com puberdade precoce central.

2.2 Objetivo específico

- Avaliar a associação entre o polimorfismo na sequência dos genes *CYP1A1*, *CYP1B1* e *CYP17* e a puberdade precoce central.

3 Casuística e Métodos

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

Este estudo foi realizado no Setor de Ginecologia da Infância e da Adolescência da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP (CAPPesq) em 07/07/2010 (protocolo de pesquisa número 1120/09 – Anexo 1). As voluntárias foram incluídas após seus responsáveis legais assinarem o termo de consentimento pós-informado livre e esclarecido (Anexos 2 e 3). Todas as meninas foram submetidas a exames clínico e ginecológico incluindo a avaliação do estágio de desenvolvimento puberal, consoante a classificação de Marshall e Tanner (1969).

3.2 Critérios de elegibilidade

3.2.1 Critérios de inclusão

- 1) Grupo Caso – pacientes com diagnóstico atual ou prévio de puberdade precoce central;
- 2) Grupo Controle – pacientes que tiveram desenvolvimento puberal após os 8 anos de idade.

3.2.2 Critérios de exclusão

Adotou-se os seguintes critérios de exclusão: presença de neoplasias ovarianas ou de supra-renal; síndrome de Cushing; síndrome de McCune-Albright; distúrbios da visão; hipotireoidismo clínico ou laboratorial; uso de medicação hormonal prévia ao diagnóstico; uso de medicamento psicotrópico ou antiepiléptico.

3.2.3 Seleção

Foram selecionadas 177 de 1685 pacientes do Setor de Ginecologia da Infância e da Adolescência da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da FMUSP. As 177 pacientes foram divididas em dois grupos conforme os critérios de elegibilidade: 1) Grupo Caso – com 73 pacientes com puberdade precoce e 2) Grupo Controle – com 104 pacientes com puberdade normal.

3.3 Métodos

3.3.1 Exames laboratoriais

Durante a pré-seleção foi coletada amostra de sangue da veia do antebraço, por punção periférica, para a realização dos seguintes exames laboratoriais: FSH, LH, prolactina, TSH, estradiol, testosterona total e S-DHEA. Estes exames foram realizados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular da FMUSP.

As pacientes do Grupo Caso, nas quais não foi possível confirmar os níveis elevados de gonadotrofinas basais, foram submetidas ao teste de estímulo com GnRH para comprovar o diagnóstico de PP.

3.3.2 Coleta e processamento do material biológico

Os protocolos de biologia molecular foram desenvolvidos no Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular - LIM58, da Disciplina de Ginecologia da FMUSP.

As amostras de sangue colhidas através de vacutainer contendo EDTA foram processadas para separar o plasma dos elementos figurados e armazenado em freezer a -20°C até o momento da extração de DNA genômico. Os leucócitos polimorfonucleares separados foram utilizados para extração do DNA total das pacientes, utilizando o kit QIAmp® DNA mini Blood (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante (anexo 4).

O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria em aparelho NanoDrop (Thermoscientific) e o perfil de integridade das amostras avaliado (500ng) por eletroforese em gel de agarose a 1%, impregnado com brometo de etídeo (Life Biosciences). Os DNAs foram armazenados em freezer a -20°C para posterior utilização nas reações.

Para análise dos polimorfismos presentes nos genes *CYP1A1*, *CYP1B1* e *CYP17* foi utilizada a técnica de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

As reações de PCR foram realizadas utilizando 50ng do DNA total em 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 0.2 mM dNTP, 0.1 mM de cada iniciador, 1.5 mM de MgSO₂ e 0.4 U de Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Life Biosciences). As condições de ciclagem foram de pré-aquecimento a 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguidos de uma etapa de extensão final de 7 minutos a 70°C. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram específicos para cada polimorfismo estudado e estão descritos na tabela 1.

Após a amplificação, os fragmentos de PCR correspondentes aos genes *CYP1A1*, *CYP1B1* e *CYP17* foram digeridos com as enzimas de restrição (Promega do Brasil) específicas para cada um dos polimorfismos descritos na literatura (tabela 1). A análise dos fragmentos foi realizada em gel de agarose 1 - 3% corados com brometo de etídeo. As condições de PCR e RFLP foram as já padronizadas para cada gene, descritas na literatura (Zheng et al, 2000; Huang et al, 1999; Feigelson et al, 1999).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos para as reações de PCR.

Gene	Iniciadores	Polimorfismo/ Enzima	Referência
<i>CYP1A1</i>	S - 5'- TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT -3' AS - 5'- CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT -3'	Transição TA/CG região 3' UTR/ MspI	Huang <i>et al.</i> (1999)
<i>CYP1B1</i>	S 5'- GTGGTTTTTGTCAACCAAGTGG -3' AS 5'- GCCTCTTGCTTCTTATTGGCA -3'	Transição Val/Leu codon 432/ Eco 571	Zheng <i>et al.</i> (2000)
<i>CYP17</i>	S - 5'-CATTGCGCACTCTGGAGTC - 3' AS - 5'- AGGCTCTTGGGGTACTTG -3'	Promotor adicional SP1 (CCACC box)/ Msp1A	Feigelson et al, (1999).

S – iniciador senso

AS – iniciador anti-senso

3.3.3 Análise Estatística

Após a coleta dos dados, foram calculadas a média, a mediana e o desvio-padrão. Em seguida, a homogeneidade da amostra foi avaliada pelo teste de Bartlett. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. No caso de comparações entre dois grupos, foi aplicado o teste de Qui-Quadrado e, nas análises de proporções, o teste de Fisher. Para os polimorfismos, foi calculado o equilíbrio de Hardy-Weinberg. As análises foram efetuadas empregando-se programa de computador SPSS versão 16.0. O poder da amostra ("Power Calculation") para 90% é de sessenta pacientes por grupo. Em todos os testes, fixou-se em 0,05 ou 5% ($p < 0,05$), o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Dados Clínicos

Foram incluídas 73 meninas com puberdade precoce central (Grupo Caso) e 104 meninas com puberdade normal (Grupo Controle) em nosso estudo. As características clínicas e epidemiológicas dos dois grupos estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 – Dados clínicos das pacientes participantes do estudo

	Grupo Controle (n = 104)	Grupo Caso (n = 73)	p
Idade de início da puberdade (meses)	114,9 ± 19,3	75,8 ± 14,9	<0,01
Menarca (meses)	143,9 ± 15,5	128,7 ± 31,6	
Menarca da mãe (meses)	147,9 ± 17,7	146,2 ± 19,3	<0,01
Antecedente familiar* (número)	19	14	0,90
Etnia			
Afrodescente	77	56	0,87
Não afrodescente	26	16	

*antecedente de puberdade precoce

Em relação a idade do início da puberdade, verificamos que as meninas do Grupo Controle (puberdade normal) tiveram a idade maior (114,9 ± 19,3 meses) que o Grupo Caso (puberdade precoce, 75,8 ± 14,9 meses, p<0.01). Além disso,

a idade da menarca do Grupo Controle ($143,9 \pm 15,5$ meses) foi significante maior que o Grupo Caso ($128,7 \pm 31,6$ meses).

Quanto a idade da menarca da mãe, não houve diferença significativa entre o Grupo Controle ($147,9 \pm 17,7$ meses) e o Grupo Caso ($146,2 \pm 19,3$ meses, $p < 0,01$).

Tanto o Grupo Controle (19 meninas) quanto o Grupo Caso (14 meninas) apresentaram a mesma proporção de antecedentes de puberdade precoce na família ($p = 0,90$).

Quanto à proporção de meninas afrodescentes em relação às não afrodescentes, observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,87$).

4.2 Genotipagem

As Figuras 3 a 5 mostram as reações de PCR-RFLP para *CYP1A1*, *CYP1B1* e *CYP 17* das participantes do estudo.

CYP1A1 – MspI

Figura 3 - Gel representativo do padrão de polimorfismo obtido na restrição com *MspI* de amostras amplificadas para *CYP1A1*. P, padrão de peso molecular de 100 pares de base. Amostras com uma única banda indicam perfil selvagem (~340 pb, linhas 12-14), enquanto as amostras com duas (~210 e ~130pb, linha 37) e três bandas (~340, ~210 e ~130pb, linhas 4-6) indicam o perfil homozigoto e heterozigoto para a mutação. As setas indicam a migração do padrão de peso molecular em 500pb.

CYP1B1 – Eco 571

Figura 4 - Gel representativo do padrão de polimorfismo obtido na restrição com Eco 571 de amostras amplificadas para *CYP1B1*. P, padrão de peso molecular de 100 pares de base. Amostras com uma única banda indicam perfil selvagem (G/G, linhas 19-21), enquanto as amostras com três bandas (G/C, linhas 29-31) e duas bandas (C/C, linhas 61-64) indicam o perfil heterozigoto e homozigoto para a mutação, respectivamente. As setas indicam a altura aproximada de migração dos três fragmentos obtidos.

CYP17 – Msp1A

Figura 5 - Gel representativo do padrão de polimorfismo obtido na restrição com Msp1A de amostras amplificadas para *CYP17*. P, padrão de peso molecular de 100 pares de base. Amostras com uma única banda indicam perfil selvagem (A1/A1, linhas 13-17), enquanto as amostras com três bandas (A1/A2, linhas 26-39) indicam o perfil heterozigoto. As setas indicam a altura aproximada de migração dos três fragmentos obtidos.

Os resultados da genotipagem estão descritos na Tabela 3. A distribuição dos genótipos de *CYP1A1* MspI ($p=0,86$) e *CYP17* ($p=0,12$) não apresentou diferença significativa entre os grupos. Para o *CYP1B1* Eco571, o genótipo mutado C/C foi mais frequente no Grupo Controle que no Grupo Caso ($p=0,03$).

Tabela 3 – Resultados da genotipagem nos dois grupos estudados

Genotipagem	Grupo Controle (n=104)			Grupo Caso (n=73)			p
	Selvagem	Heterozigoto	Homozigoto	Selvagem	Heterozigoto	Homozigoto	
<i>CYP1A1</i> (n)	60 (W/W)	41 (W/VT)	3 (VT/VT)	40 (W/W)	30 (W/VT)	3 (VT/VT)	0,86
<i>CYP17</i> (n)	35 (A1/A1)	69 (A1/A2)	0 (A2/A2)	33 (A1/A1)	40 (A1/A2)	0 (A2/A2)	0,12
<i>CYP1B1</i> (n)	29 (G/G)	38 (G/C)	37 (C/C)	23 (G/G)	37 (G/C)	13 (C/C)	0,03

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

O determinismo da puberdade ainda não é totalmente conhecido. Por isso, discute-se muito sobre os reais mecanismos que poderiam estar envolvidos, como a suscetibilidade genética de cada indivíduo (incluindo as mutações e polimorfismos) e a interação de fatores nutricionais (desnutrição ou obesidade) e ambientais (disruptores endócrinos) (Krstevska-Konstantinova et al., 2001). Contudo, há ainda controvérsias quanto ao fator preponderante. Desta forma, salienta-se ainda que os fatores genéticos que influenciariam o determinismo da puberdade não foram totalmente desvendados (Jarzabek-Bielecka et al., 2011), necessitando de mais investigação.

Os trabalhos epidemiológicos sugerem que muitas meninas com puberdade precoce têm a mãe com o mesmo antecedente (de Vries et al., 2004), sugerindo possível herança genética. Contudo, pouco ainda se conhece sobre as alterações gênicas envolvidas no desenvolvimento sexual em idade precoce. Todavia, deve-se mencionar que esta afecção tem repercussões negativas para as pacientes. Em geral, a estatura final seria inferior ao seu potencial genético, o que pode trazer consequências na esfera psicossocial na idade adulta, incluindo problemas afetivos e distorção da auto-estima e da auto-imagem (Loomba-Albrecht e Styne, 2012). Portanto, a investigação dos mecanismos que levam à puberdade precoce é muito importante para se instituir um tratamento precoce e também para a elaboração de novos tratamentos nos casos de resposta inadequada.

De fato, a avaliação dos mecanismos gênicos que estariam envolvidos na gênese da puberdade precoce poderia auxiliar na descoberta de marcadores genéticos para o diagnóstico mais precoce, bem como o desenvolvimento de novas terapias (farmacogenética) mais efetivas, o que poderia propiciar melhora do prognóstico, ou seja, maior estatura. Neste ponto, este estudo mostra que a ausência de polimorfismo do *CYP1B1* aumentaria o risco de puberdade precoce.

A maioria dos estudos que avalia a influência dos fatores genéticos no determinismo da puberdade precoce correlacionam fatores centrais, relacionados aos neurotransmissores (Ottem et al., 2002; Dungan et al., 2006; Navarro et al., 2007; Freitas et al., 2006). Poucos estudos avaliaram o componente periférico como desencadeante da puberdade precoce (Rasier et al., 2005; Gorai et al., 2003). Portanto, nosso estudo pretendeu aumentar o conhecimento sobre este componente.

Muitos investigadores discutem o papel do estrogênio em diversas afecções ginecológicas, como endometriose, leiomioma, câncer mamário e puberdade precoce (Longui et al., 2001). Acredita-se que neste último processo, o estradiol talvez não fosse apenas consequência, mas possivelmente um fator contribuinte no amadurecimento precoce do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano (Gorai et al., 2003; Moenter et al., 2003; Ronnekleiv et al., 2012). Por esta razão, escolhemos os polimorfismos que poderiam alterar a esteroidogênese e, conseqüentemente, as concentrações séricas de estrogênio e/ou aumento de metabólitos com maior ação sobre o receptor esteroídico.

Em modelos animais, o estrogênio age diferentemente conforme o núcleo hipotalâmico: estimula o núcleo paraventricular para produção de GnRH e inibe o

núcleo arqueado (Clarkson et al., 2008; Gottsch et al., 2009). Contudo, este mecanismo pode ser oposto, com o estrogênio aumentando a liberação de GnRH, como ocorre no meio do ciclo menstrual na mulher no período periovulatório (Speroff e Fritz, 2011).

Até o presente, não existem descrições sobre pacientes com puberdade precoce avaliadas em relação aos polimorfismos dos genes *CYP1A1*, *CYP1B1* e *CYP17*. Entretanto, alguns investigadores já avaliaram estes genes em relação à idade da menarca (Gorai et al., 2003; Haiman et al., 1999; Mitchell et al., 2008). Além disso, existem estudos com os polimorfismos destes genes e outras afecções ginecológicas, como endometriose (Huber et al., 2005) e câncer mamário (Feigelson et al., 1999; Zheng et al., 2000; Huang et al., 1999).

Feigelson et al. (1999) mostraram que as mulheres homozigotas para o alelo A2 (polimorfismo do *CYP17*) na pós-menopausa teriam maior disponibilidade hormonal, bem como elevação do risco para câncer mamário. Zheng et al. (2000) avaliaram 186 pacientes com câncer de mama e 200 mulheres sem esse câncer. Encontraram risco elevado de câncer nas mulheres com este polimorfismo, com OR de 2,3 (95% CI, 1,2 – 4,3), muito próximo do risco de mulheres com antecedente familiar para esta afecção. Huang et al. (1999) analisaram o *CYP1A1* e mostraram que o alelo homozigoto *CYP1A1*vt/vt, que contém o polimorfismo, associou-se a maior risco para câncer de mama nas mulheres na pós-menopausa, com OR de 3,0 (95% CI, 1,03 – 8,89). Isto sugere que este incremento estaria relacionado com os metabólitos mais ativos como o 16-hidroxiestradiol (HE₂).

É oportuno salientar que um fator de risco associado ao carcinoma mamário seria a menarca precoce. Conforme exposto anteriormente, talvez as enzimas do complexo CYP estariam relacionadas a puberdade precoce pela interferência com o metabolismo do estrogênio. Contudo, em nosso estudo não observamos associação positiva desta afecção com o polimorfismo estudado.

As enzimas do complexo CYP que participam do processo de esteroidogênese são importantes tanto na produção como na biodisponibilidade e degradação do estrogênio. Vários estudos identificaram mutações nesse complexo enzimático que podem influenciar no surgimento e prognóstico de doenças (van Schaik, 2005). Por estas razões, escolhemos os genes *CYP1A1*, *CYP1B1* e *CYP17* para serem estudados.

Em relação ao *CYP1A1*, o polimorfismo decorrente da substituição de citosina por timina na região não codificante 3' cria um sítio de restrição *MspI* que permite a identificação dos genótipos *CYP1A1*wt/wt (homozigoto selvagem), *CYP1A1*wt/vt (heterozigoto), *CYP1A1*vt/vt (homozigoto mutado).

O *CYP1A1* é a enzima que participa do processo de hidroxilação do estrogênio, levando à formação dos seus metabólitos HE_2 , como o 4- HE_2 e o 16 α - HE_2 , com atividade hormonal muito potente (Huang et al., 1999) sobre o receptor de estrogênio. Gorai et al. (2003) estudaram 317 mulheres japonesas na pós menopausa e concluíram que não houve diferença significativa entre os grupos avaliados quanto ao polimorfismo do *CYP1A1* em relação à idade da menarca. Em nossa casuística, também não observamos maior frequência destes polimorfismos no gene *CYP1A1* em pacientes com puberdade precoce.

A troca de timina por citosina na região 5'- não traduzida do *CYP17* cria o sítio de restrição Msp1A que identifica dois alelos, o A1 (normal ou selvagem) e o A2 (mutado). O alelo A2 aumenta a expressão do *CYP17*, incrementando a biossíntese do estradiol (Feigelson et al., 1999).

A enzima CYP17 catalisa a atividade de 17 α -hidroxilase e de 17-20-liase, aumentando a biossíntese de androgênios e estrogênios (Nogueira Jr et al., 2011). Em estudos relacionando o polimorfismo do *CYP 17* em mulheres com câncer de mama, Feigelson et al. (1997) associaram a presença do alelo A2 a idade mais precoce da menarca (13,0 vs 13,4 anos) enquanto Haiman et al. (1999) não encontraram diferença significativa. Nossos dados sugerem que este gene não participaria do determinismo da puberdade precoce.

O gene *CYP1B1* encontra-se no cromossomo 2, região 2p21-22, contém três exons e codifica o citocromo P450-1B1, enzima que faz parte da superfamília de monoxigenases contendo o grupo heme e é responsável pelo metabolismo oxidativo do estradiol. O seu polimorfismo resulta da troca de uma base G por C no exon 3, que leva à troca de valina por leucina no códon 432 criando um sítio de restrição Eco 571.

O CYP1B1 tem papel importantíssimo, participando dos processos de hidroxilação e conjugação que catalisam a formação do 4- HE₂ (Zheng et al., 2000). A expressão do *CYP1B1* é regulada por meio do estradiol, ligando-se ao seu receptor. Alterações no nível de expressão do *CYP1B1* não só alteram a intensidade da ação do estrogênio, mas também podem alterar o perfil do seu efeito fisiológico no fígado e nos tecidos-alvo. Em tecidos-alvos como miométrio, em leiomiomas e em tumores mamários benignos, foi detectada elevação de 4-

HE₂. Nestes locais foram também confirmados aumento da expressão de *CYP1B1*, sendo a 4-hidroxilação do estrogênio a via predominante. Além disso, o nível de expressão de *CYP1B1* é abundante em tecidos tumorais, sendo maior que em tecidos normais (Tsuchiya et al., 2005).

Parece que a relação do *CYP1B1* e a carcinogênese mamária e endometrial ocorre principalmente pela formação de metabólitos tóxicos chamados pró-carcinógenos e pró-mutagênicos e não pela potência hormonal, uma vez que 4-hidroxilação de estrogênio pelo *CYP1B1* leva a redução da sua atividade estrogênica (Tsuchiya et al., 2005). Salienta-se que a maior produção de SHBG no fígado pode diminuir a disponibilidade deste metabólito bem como a do estrogênio (Speroff e Fritz, 2011). Outra possibilidade seria que este polimorfismo não participasse do determinismo da puberdade. De fato, Mitchell et al. (2008) estudaram 152 mulheres brancas e concluíram que o polimorfismo do *CYP1B1* não está associado a idade da menarca.

Finalmente, encontramos associação inversa do *CYP1B1* com puberdade precoce. Nossos dados sugerem que a variação do gene *CYP1B1* Eco571 poderia estar associada ao determinismo da puberdade. Portanto, seria importante direcionar pesquisas futuras para a investigação funcional deste polimorfismo.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

Nossos dados permitem concluir que:

- a) Não houve associação do polimorfismo do *CYP1A1* MspI com a puberdade precoce central;
- b) Não houve associação entre o polimorfismo do *CYP17* e as meninas com puberdade precoce central;
- c) Houve associação positiva entre o polimorfismo do *CYP1B1* Eco571 e as meninas com puberdade normal.

7 Anexos

ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética

HC

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 07/07/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1120/09**, intitulado: **"ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE GENES RELACIONADOS COM A PUBERDADE EM MENINAS COM PUBERDADE PRECOCE VERDADEIRA"**, apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. EDMUND CHADA BARACAT**
Pesquisador (a) Executante: **DR. CEZAR NOBORU MATSUZAKI**

CAPPesq, 08 de Julho de 2010

PROF. DR. CLAUDIO LEONE
Vice-Presidente da Comissão Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hnet.usp.br

1120

ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Caso

DISCIPLINA DE GINECOLOGIA DO DEPARTAMENTO DE OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE
 CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO.:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : **Análise do polimorfismo de genes relacionados com a puberdade em meninas com puberdade precoce verdadeira**

PESQUISADOR : **Prof. Dr. Edmund C. Baracat**

CARGO/FUNÇÃO **Professor Titular da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **28.085**

UNIDADE DO HCFMUSP: **Pesquisador do LIM – 58**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: RISCO MÍNIMO ☒ X
 RISCO MÉDIO ☐ RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 18 meses

1 – Desenho do estudo e objetivo(s):

O desenvolvimento das mamas e pêlos pubianos em meninas antes dos 8 anos de idade é chamado puberdade precoce. A puberdade precoce pode ter como consequência a redução da altura final e alterações psicológicas. Por isso, o seu diagnóstico e tratamento é muito importante. Uma das principais causas ligadas ao início da puberdade é a genética.

Essas informações estão sendo fornecidas para a participação voluntária da sua filha neste estudo, que tem como objetivo estudar as causas genéticas que podem estar relacionadas à puberdade precoce.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros:

Levantaremos a ficha médica de sua filha para saber sobre a sua doença, o estágio do tratamento, os remédios que ela toma, e outras informações que possam ser úteis. Sua filha será examinada em consulta (exame clínico geral, neurológico e ginecológico). Ela passará por uma avaliação que incluirá exames laboratoriais de sangue, além de ultrassonografia pélvica para avaliação do útero e dos ovários.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados

Aplicação de uma medicação na veia (GnRH 100µg) com coleta de sangue de veia do antebraço (total de 03 coletas com intervalo de 30 minutos entre cada uma). Este exame é feito para confirmarmos que sua filha tem o diagnóstico de puberdade precoce. Esse material será utilizado para análise das causas genéticas que podem estar relacionadas à puberdade precoce.

O exame de ultrassonografia pélvica será realizado pelo abdome, após a paciente tomar bastante água para ficar com a bexiga cheia.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3:

Exame de sangue – a coleta de sangue poderá causar um leve desconforto no local da picada, que deve desaparecer em um dia.

Ultrassonografia – apenas um leve desconforto relacionado a bexiga cheia, que melhora após urinar.

5 – Benefícios para o participante – as informações coletadas neste projeto poderão auxiliar em futuros tratamentos.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: O representante legal pode optar pela filha não participar deste estudo e mesmo assim esta continuará realizando o acompanhamento e tratamento normalmente.

7 – Garantia de acesso:

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr **Edmund C. Baracat** que pode ser encontrado no endereço **Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo na Av: Dr Eneas Carvalho de Aguiar, 255, 10º andar sala 10.166, Cerqueira Cesar, CEP 05403-000 Telefone(s) 3069-7838, e-mail: secretaria.gin@hcnet.usp.br**. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappelq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Análise do polimorfismo de genes relacionados com a puberdade em meninas com puberdade precoce verdadeira”.

Eu discuti com o Dr **Edmund C. Baracat** sobre a decisão da participação de minha filha nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação de minha filha é isenta de despesas e que esta tem garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente que ela participe deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que minha filha possa ter adquirido, ou no seu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal _____ Data ____/____/____

Assinatura da testemunha _____ Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Prof. Dr. Edmund C. Baracat

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do pesquisador responsável

ANEXO 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle

DISCIPLINA DE GINECOLOGIA DO DEPARTAMENTO DE OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : **Análise do polimorfismo de genes relacionados com a puberdade em meninas com puberdade precoce verdadeira**

PESQUISADOR : **Prof. Dr. Edmund C. Baracat**

CARGO/FUNÇÃO **Professor Titular da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **28.085**

UNIDADE DO HCFMUSP: **Pesquisador do LIM – 58**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: RISCO MÍNIMO ☒ X
RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 18 meses

1 – Desenho do estudo e objetivo(s):

O desenvolvimento das mamas e pêlos pubianos em meninas antes dos 8 anos de idade é chamado puberdade precoce. A puberdade precoce pode ter como consequência a redução da altura final e alterações psicológicas. Por isso, o seu diagnóstico e tratamento é muito importante. Uma das principais causas ligadas ao início da puberdade é a genética. Para estudar as causas genéticas que podem estar relacionadas à puberdade precoce, precisamos da participação de meninas que não tem puberdade precoce para comparar seus genes (elementos do corpo, DNA das células, que controlam o desenvolvimento da puberdade) com o de meninas com puberdade precoce.

Essas informações estão sendo fornecidas para a participação voluntária da sua filha, que não tem puberdade precoce, neste estudo, que tem como objetivo estudar as causas genéticas que podem estar relacionadas à puberdade precoce.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros:

Levantaremos a ficha médica de sua filha para saber sobre a sua doença, o estágio do tratamento, os remédios que ela toma, e outras informações que possam ser úteis. Sua filha será examinada em consulta (exame clínico geral, neurológico e ginecológico). Ela passará por uma avaliação que incluirá exames laboratoriais de sangue, além de ultrassonografia pélvica para avaliação do útero e dos ovários.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados

Será feito 01 coleta de sangue de veia do antebraço. Esse material será utilizado para análise das causas genéticas que podem estar relacionadas à puberdade precoce.

O exame de ultrassonografia pélvica será realizado pelo abdome, após a paciente tomar bastante água para ficar com a bexiga cheia.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3:

Exame de sangue – a coleta de sangue poderá causar um leve desconforto no local da picada, que deve desaparecer em um dia.

Ultrassonografia – apenas um leve desconforto relacionado a bexiga cheia, que melhora após urinar.

5 –O representante legal pode optar pela filha não participar deste estudo e mesmo assim esta continuará realizando o acompanhamento e tratamento neste Serviço.

6 – Benefícios para participante:

Durante a participação, sua filha irá realizar exames que podem mostrar como está a sua saúde ginecológica (hormônios e avaliação do útero e ovários).

7 – Garantia de acesso:

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr **Edmund C. Baracat** que pode ser encontrado no endereço **Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo na Av: Dr Eneas Carvalho de Aguiar, 255, 10º andar sala 10.166, Cerqueira Cesar, CEP 05403-000** Telefone(s) **3069-7838**, e-mail: **secretaria.gin@hcnet.usp.br**. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: **cappesq@hcnet.usp.br**
8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “ Análise do polimorfismo de genes relacionados com a puberdade em meninas com puberdade precoce verdadeira”.

Eu discuti com o Dr **Edmund C. Baracat** sobre a decisão da participação de minha filha nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação de minha filha é isenta de despesas e que esta tem garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente que ela participe deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que minha filha possa ter adquirido, ou no seu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____
Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Prof. Dr. Edmund C. Baracat Data ____/____/____
Assinatura do pesquisador responsável

ANEXO 4 - Protocolo de extração do DNA - kit QIAmp® DNA mini Blood (Qiagen)

- -Etapas de centrifugação à T ambiente (15-25 °C)
- -Utilizar um carreador de DNA se a amostra contiver menos de 10,000 equivalentes de genoma
- -200 µl de sangue total originam 3-12 µg de DNA
- -Equilibrar as amostras à T ambiente
- -Aquecer o heating block á 56°C
- -Equilibrar o tampão AE ou água destilada à T° ambiente
- - Certificar o correto preparo dos tampões AW1, AW2 e protease (kit), (ver pag. 17)
- - Se ocorrer precipitação no tampão AL, dissolvê-lo por incubação á 56°C

Procedimento

1. Pipetar 20 µl de protease Qiagen (ou proteinase K) no fundo de microtubo de 1,5 ml
2. Adicionar 200µl de amostra ao tubo. Utilizar volume superior á 200µl de sangue total, plasma, soro, buffy coat e fluidos corpóreos ou concentração acima de 5×10^6 de linfócitos em 200µl de PBS. Se o volume original da amostra < 200µl, adicionar o apropriado volume de PBS
Se houver necessidade de eliminação de RNA da amostra, adicionar 4µl de uma solução estoque de RNase A (100mg/ml) antes da adição do TAL
3. Adicionar 200µl de TAL à amostra
Se o volume original da amostra > 200µl, aumentar proporcionalmente o volume de proteinase K e tampão AL (ex: para amostra de 400µl, adicionar 40µl de proteinase e 400µl de TAL)
Vortexar por pulso por 15" até obter uma solução homogênea
4. Incubar à 56°C por 10'
5. Centrifugar brevemente a amostra
6. Adicionar 200µl de etanol (96-100%)
Se o volume original da amostra > 200µl, aumentar proporcionalmente o volume de etanol
Vortexar por pulso por 15"
Centrifugar brevemente a amostra
7. Aplicar a amostra cuidadosamente na coluna em um tubo de 2ml sem molhar a borda
Fechar a tampa e centrifugar à 6000xg (8000rpm) por 1'
Para amostras de buffy coat ou linfócitos, centrifugar à velocidade máxima
Transferir a coluna para tubo de coleta de 2ml (kit)
Descartar o tubo e filtrado
8. Abrir cuidadosamente a tampa
Adicionar 500µl de TAW1 sem molhar a borda
Fechar a tampa e centrifugar à 6000xg (8000rpm) por 1'
Para DNA extraído de buffy coat ou linfócitos, recomenda-se centrifugar à velocidade máxima

Transferir a coluna para tubo de coleta de 2ml (kit)

Descartar o tubo e filtrado

Não é necessário aumentar o volume de TAW1 se volume original da amostra > 200µl

9. Abrir cuidadosamente a tampa

Adicionar 500µl de TAW2 sem molhar a borda

Fechar a tampa e centrifugar à velocidade máxima por 3'

10. Transfira a coluna para tubo novo de 2ml

Descartar o tubo e filtrado

Centrifugar a velocidade máxima por 1'

11. Transferir a coluna para tubo novo de 1,5ml

Abrir a tampa e adicionar 200µl de TAE ou água destilada

Incubar à T ambiente por 1' (Incubação por 5' aumenta o rendimento de DNA)

Centrifugar à 6000xg (8000rpm) por 1' (um 2º passo de eluição com 200µl de TAE, aumenta o rendimento de DNA em 15%)

Para amostras < 1 µg de DNA, eluir com 50 µl de TAE ou água destilada

12. Armazenar a amostra à -20 °C

8 Referências

8 REFERÊNCIAS

- Andersen AN, Hagen C, Lange P, Boesgaard S, Djursing H, Eldrup E, Micic S. Dopaminergic regulation of gonadotropin levels and pulsatility in normal women. *Fertil Steril*. 1987;47(3):391-7.
- Antoniazzi F, Zamboni G. Central precocious puberty: current treatment options. *Paediatr Drugs*. 2004;6 (4):211 –231.
- Bäckström CT, McNeilly AS, Leask RM, Baird DT. Pulsatile secretion of LH, FSH, prolactin, oestradiol and progesterone during the human menstrual cycle. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1982;17(1):29-42.
- Balasubramaniam A. Clinical potentials of neuropeptide Y family of hormones. *Am J Surg* 2002;183:430-34.
- Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev*. 2001;22(6):724-63.
- Blair IA. Analysis of estrogens in serum and plasma from postmenopausal women: past present, and future. *Steroids*. 2010;75(4-5):297-306.
- Brito VN, Batista MC, Borges MF, Latronico AC, Kohek MB, Thirone AC, Jorge BH, Arnhold IJ, Mendonça BB. Diagnostic value of fluorometric assays in the evaluation of precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:3539–3544.
- Brito VN, Mendonça BB, Guilhoto LM, Freitas KC, Arnhold IJ, Latronico AC. Allelic variants of the gamma-aminobutyric acid-A receptor alpha1-subunit gene (GABRA1) are not associated with idiopathic gonadotropin-dependent precocious puberty in girls with and without electroencephalographic abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(6):2432-6.
- Brito VN, Latronico AC, Arnhold IJ, Mendonça BB. Update on the etiology, diagnosis and therapeutic management of sexual precocity. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2008;52:18–31
- Carel JC, Lahlou N, Jaramillo O, Montauban V, Teinturier C, Colle M, Lucas C, Chaussain JL. Treatment of central precocious puberty by subcutaneous injections of leuporelin 3-month depot (11.25 mg). *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(9):4111-6.
- Carel JC, Lahlou N, Roger M, Chaussain JL. Precocious puberty and statural growth. *Hum Reprod Update*. 2004;10(2):135-47.
- Carel JC, Eugster EA, Rogol A, Ghizzoni L, Palmert MR; ESPE-LWPES GnRH Analogs Consensus Conference Group, Antoniazzi F, Berenbaum S, Bourguignon JP, Chrousos GP, Coste J, Deal S, de Vries L, Foster C, Heger S, Holland J, Jahnukainen K, Juul A, Kaplowitz P, Lahlou N, Lee MM, Lee P, Merke DP, Neely

EK, Oostdijk W, Phillip M, Rosenfield RL, Shulman D, Styne D, Tauber M, Wit JM. Consensus statement on the use of gonadotropin-releasing hormone analogs in children. *Pediatrics*. 2009;123(4):e752-62.

Chemaitilly W, Trivin C, Adan L, Gall V, Sainte-Rose C, Brauner R. Central precocious puberty: clinical and laboratory features. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001;54(3):289-94.

Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Moreno AS, Colledge WH, Herbison AE. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci*. 2008;28(35):8691-7.

Damiani, D: Diagnóstico laboratorial da puberdade precoce. *Arq. bras. endocrinol. Metab* 2002;46(1):85-90.

De Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KISS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10972–10976.

deVries L, Kauschansky A, Shohat M, Phillip M. Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:1794-800.

Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA. Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 2006;147 (3): 1154–8.

Emons G, Ortmann O, Fingscheidt U, Ball P, Knuppen R. Short-term effects of oestradiol and 4-hydroxyoestradiol on gonadotrophin-releasing hormone induced luteinizing hormone secretion by rat pituitary cells in culture. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1986;111(3):312-20.

Feigelson HS, Coetzee GA, Kolonel LN, Ross RK, Henderson BE. A polymorphism in the CYP17 gene increases the risk of breast cancer. *Cancer Res*. 1997;57(6):1063-5.

Feigelson HS, McKean-Cowdin R, Pike MC, Coetzee GA, Kolonel LN, Nomura AM, Le Marchand L, Henderson BE. Cytochrome P450c17alpha gene (CYP17) polymorphism predicts use of hormone replacement therapy. *Cancer Res*. 1999;59(16):3908-10.

Freitas KC, Ryan G, Brito VN, Tao YX, Costa EM, Mendonca BB, Segaloff D, Latronico AC. Molecular analysis of the neuropeptide Y1 receptor gene in human idiopathic gonadotropin-dependent precocious puberty and isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril*. 2007;87(3):627-34.

Gorai I, Tanaka K, Inada M, Morinaga H, Uchiyama Y, Kikuchi R, Chaki O, Hirahara F. Estrogen-metabolizing gene polymorphisms, but not estrogen

receptor-alpha gene polymorphisms, are associated with the onset of menarche in healthy postmenopausal Japanese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(2):799-803.

Gottsch ML, Navarro VM, Zhao Z, Glidewell-Kenney C, Weiss J, Jameson JL, Clifton DK, Levine JE, Steiner RA. Regulation of Kiss1 and dynorphin gene expression in the murine brain by classical and nonclassical estrogen receptor pathways. *J Neurosci.* 2009;29(29):9390-5.

Greulich WW, Pyle SI. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. 2nd ed. Stanford, Calif.: Stanford University Press, 1959.

Grumbach MM. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res.* 2002;57(2):2-14.

Haiman CA, Hankinson SE, Spiegelman D, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE, Kelsey KT, Hunter DJ. The relationship between a polymorphism in CYP17 with plasma hormone levels and breast cancer. *Cancer Res.* 1999 Mar;59(5):1015-20.

Heger S, Sippell WG, Partsch CJ. Gonadotropin-releasing hormone analogue treatment for precocious puberty. Twenty years of experience. *Endocr Dev.* 2005; 8:94-125.

Herbison AE. Noradrenergic regulation of cyclic GnRH secretion. *Rev Reprod.* 1997;2(1):1-6.

Huang CS, Chern HD, Chang KJ, Cheng CW, Hsu SM, Shen CY. Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the estrogen-metabolizing genes CYP17, CYP1A1, and COMT: a multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer Res.* 1999;59(19):4870-4875.

Huber A, Keck CC, Hefler LA, Schneeberger C, Huber JC, Bentz EK, Tempfer CB. Ten estrogen-related polymorphisms and endometriosis: a study of multiple gene-gene interactions. *Obstet Gynecol.* 2005;106(5 Pt 1):1025-31.

Jarzabek-Bielecka G, Warchoń-Biedermann K, Sowińska E, Wachowiak-Ochmańska K. Precocious puberty. *Ginek Pol.* 2011;82(4):281-6.

Klein KO, Barnes KM, Jones JV, Feuillan PP, Cutler GB Jr. Increased final height in precocious puberty after long-term treatment with LHRH agonists: the National Institutes of Health experience. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(10):4711-6.

Krstevska-Konstantinova M, Charlier C, Craen M, Du Caju M, Heinrichs C, de Beaufort C, Plomteux G, Bourguignon JP. Sexual precocity after immigration from developing countries to Belgium: Evidence of previous exposure to organochlorine pesticides. *Hum Reprod* 2001;16:1020-1026.

Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1731-1737.

Loomba-Albrecht LA, Styne DM. The physiology of puberty and its disorders. *Pediatr Ann*. 2012;41(4):e1-9.

Longui C A, Calliari LE, Monte O. Revisão Crítica do Diagnóstico e Tratamento da Puberdade Precoce Central. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2001;45(1): 48-57.

Maganhin CC, Carbonel AAF, Hatty JH, Fuchs LFP, Oliveira-Junior IS, Simões MJ, Simões RS, Baracat EC, Soares-Jr JM. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. *RAMB* 2008;54(3): 267-71.

Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Paul SJ, Ortolano GA, Kelch RP. Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res*. 1991;47:155-87.

Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of puberal changes in girls. *Arch Dis Child*. 1969; 44:291-303.

McCartney CR, Gingrich MB, Hu Y, Evans WS, Marshall JC. Hypothalamic regulation of cyclic ovulation: evidence that the increase in gonadotropin-releasing hormone pulse frequency during the follicular phase reflects the gradual loss of the restraining effects of progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2194-200.

McShane TM, May T, Miner JL, Keisler DH. Central actions of neuropeptide-Y may provide a neuromodulatory link between nutrition and reproduction. *Biol Reprod* 1992;46:1151-7.

Mitchell ES, Farin FM, Stapleton PL, Tsai JM, Tao EY, Smith-DiJulio K, Woods NF. Association of estrogen-related polymorphisms with age at menarche, age at final menstrual period, and stages of the menopausal transition. *Menopause*. 2008;15(1):105-11.)

Moenter SM, Defazio RA, Straume M, Nunemaker CS. Steroid regulation of GnRH neurons. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1007:143-52.

Molina-Carballo A, Fernandez-Tardaguila E, Uberos-Fernandez J, Seiquer I, Contreras-Chova F, Munoz-Hoyos A. Longitudinal study of the simultaneous secretion of melatonin and leptin during normal puberty. *Horm Res*. 2007;68(1):11-9.

Navarro VM, Castellano JM, García-Galiano D, Tena-Sempere M. Neuroendocrine factors in the initiation of puberty: the emergent role of kisspeptin. *Rev Endocr Metab Disord* 2007;8:11–20.

Nogueira RC Jr, Costa AM, Silva ID, Carvalho CV, Maganhin C, Baracat EC, Soares JM Jr. Influence of the CYP17 polymorphism on vasomotor symptoms in postmenopausal women: a pilot study. *Climacteric*. 2011;14(5):537-43.

Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent AS, Matagne V, Mungenast AE. Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology* 2006;147(3):1166-74.

Ottem EN, Godwin JG, Petersen SL. Glutamatergic signaling through the N-methyl-D-aspartate receptor directly activates medial subpopulations of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons, but does not appear to mediate the effects of estradiol on LHRH gene expression. *Endocrinology* 2002;143(12):4837-45.

Papathanasiou A, Hadjiathanasiou C. Precocious puberty. *Pediatr Endocrinol Rev* 2006;3(1):182-7.

Parent AS, Rasier G, Gerard A, Heger S, Roth C, Mastronardi C, Jung H, Ojeda SR, Bourguignon JP. Early onset of puberty: tracking genetic and environmental factors. *Horm Res* 2005;64(2):41-7.

Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon JP. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Rev* 2003;24:668–693.

Pau KY, Berria M, Hess DL, Spies HG. Hypothalamic site-dependent effects of neuropeptide Y on gonadotropin-releasing hormone secretion in rhesus macaques. *J Neuroendocrinol*. 1995;7(1):63-7.

Plant TM, Barker-Gibb ML. Neurobiological mechanisms of the puberty in higher primates. *Hum Reprod Update* 2004;10:67-77.

Rasier G, Matagne V, Parent AS, Gerard A, Lebrethon MC, Bourguignon JP. Estradiol and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) administration in infantile female rats: Similar stimulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in vitro and sexual maturation in vivo through different receptor mechanisms; in Proceedings of the 87th Annual Meeting of the Endocrine Society. San Diego: Endocrine Society, 2005:190.

Ronnekleiv OK, Bosch MA, Zhang C. Regulation of endogenous conductances in GnRH neurons by estrogens. *Brain Res* 2010;1364: 25–34.

Ronnekleiv OK, Bosch MA, Zhang C. 17 β -oestradiol regulation of gonadotrophin-releasing hormone neuronal excitability. *J Neuroendocrinol*. 2012;24(1):122-30.

Sahu A, Phelps CP, White JD, Crowley WR, Kalra SP, Kalra PS. Steroidal regulation of hypothalamic neuropeptide Y release and gene expression. *Endocrinology* 1992;130:3331-6.

Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature*. 1989;338(6211):161-4.

Smith JT, Clarke IJ. Kisspeptin expression in the brain: catalyst for the initiation of puberty. *Rev Endocr Metab Disord* 2007;8:1–9.

Soriano Guillén L, Argente J. Peripheral precocious puberty: clinical, diagnostic and therapeutical principles. *An Pediatr*. 2012;76(4):229.e1-10.

Speroff L, Fritz MA. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011.

Stojilkovic SS, Krsmanovic LZ, Spergel DJ, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone neurons: intrinsic pulsatility and receptor-mediated regulation. *Trends Endocrinol Metab*. 1994;5(5):201-9.

Teilmann G, Pedersen CB, Jensen TK, Skakkebaek NE, Juul A. Prevalence and incidence of precocious pubertal development in Denmark: an epidemiologic study based on national registries. *Pediatrics*. 2005;116(6):1323-8.

Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, Seminara SB, Mendonca BB, Kaiser UB, Latronico AC. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med*. 2008;358(7):709-15.

Tsuchiya Y, Nakajima M, Yokoi T. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett*. 2005;227(2):115-24.

van Schaik RH. Cancer treatment and pharmacogenetics of cytochrome P450 enzymes. *Invest New Drugs*. 2005;23(6):513-22.

Zheng W, Xie DW, Jin F, Cheng JR, Dai Q, Wen WQ, Shu XO, Gao YT. Genetic polymorphism of cytochrome P450-1B1 and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9(2):147-50.