

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Instituto de Ciências Básicas da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE DO  
RECEPTOR DE VITAMINA D (*VDR*) E DO SNP-71A/G DO GENE 17 $\beta$ -  
HIDROXIESTERÓIDE DESIDROGENASE TIPO 5 (*HSD17B5*) E VARIÁVEIS  
CLÍNICAS, HORMONAIAS E METABÓLICAS EM PACIENTES COM PUBARCA  
PRECOCE E CONTROLES**

**BETÂNIA RODRIGUES DOS SANTOS**

**Porto Alegre**  
**Março de 2011**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE DO  
RECEPTOR DE VITAMINA D (*VDR*) E DO SNP-71A/G DO GENE 17 $\beta$ -  
HIDROXIESTERÓIDE DESIDROGENASE TIPO 5 (*HSD17B5*) E VARIÁVEIS  
CLÍNICAS, HORMONAIS E METABÓLICAS EM PACIENTES COM PUBARCA  
PRECOCE E CONTROLES**

Betânia Rodrigues dos Santos  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Poli Mara Spritzer

Dissertação apresentada ao Curso  
de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Fisiologia, UFRGS,  
como requisito parcial para a  
obtenção do grau de mestre.

Porto Alegre  
Março de 2011

## APRESENTAÇÃO

### **Instituições participantes:**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Universidade Federal do Paraná/Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

**Título:** Estudo da associação entre polimorfismos do gene do receptor de vitamina D (*VDR*) e do SNP-71A/G do gene 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 5 (*HSD17B5*) e variáveis clínicas, hormonais e metabólicas em pacientes com pubarca precoce e controles.

### **Pesquisadores participantes:**

- Betânia Rodrigues dos Santos, bióloga. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia/ UFRGS.
- Profa. Dra. Poli Mara Spritzer, orientadora, Profa. Titular da UFRGS e Coordenadora da Unidade de Endocrinologia Ginecológica do Serviço de Endocrinologia do HCPA.
- Fabíola Satler, colaboradora no projeto, especialista em medicina interna e endocrinologia. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Endocrinologia/ UFRGS.
- Profa. Dra. Margaret C. S. Boguszewski, coordenadora do projeto colaborativo desenvolvido na UFPR, Profa. Adjunto IV do Departamento de Pediatria da Universidade Federal do Paraná e integrante da Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFPR.
- Dr. Luis Paulo Gomes Mascarenhas, Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente pela Pediatria da Universidade Federal do Paraná, colaborador na equipe da UFPR.

### **Local da pesquisa:**

- Unidade de Endocrinologia Ginecológica, Laboratórios de Endocrinologia Molecular, Depto Fisiologia/UFRGS e de Biologia Molecular do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- Unidade de Endocrinologia Pediátrica da Universidade Federal do Paraná.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha família, mãe Patricia, pai Antônio Carlos, Irmão Isaac, Camila, Julia e Laura, cunhada Ana Claudia, meus sobrinhos Éric e Lucca, meu avós Carmem e Isaac e, Enilda e Ágar (*in memoriam*). Agradeço por todo amor, incentivo, compreensão e por estarem ao meu lado, mesmo que em pensamento, em todos esses momentos importantes. Agradeço ao meu noivo, Rodrigo Rickes Azevedo, por ser o meu maior incentivador em todo esse período, por não me deixar desanimar, por compreender os meus momentos de ausência e principalmente por me mostrar que as coisas podem ser mais simples e bonitas do que parecem.

Aos meus tios, João Egídio e Sara Gamboa, e as primas Jeanne, Tatiana e Juanita por terem me acolhido de forma tão carinhosa e confortante durante essa jornada. Por terem sido minha segunda família, por terem me acompanhado e participado de todas as minhas angústias e alegrias.

Agradeço aquelas que são minhas irmãs por opção, Alinca da Fonseca, Liziane da Silva e Marília Mesemburg, agradeço pela amizade, pelas horas de descontração e desafogo que me proporcionaram, pelo companheirismo e pelas palavras de apoio e conforto durante os momentos mais desgastantes.

Um agradecimento muito especial a minha orientadora D<sup>ra</sup>. Poli Mara Spritzer. Pelos ensinamentos, sugestões e, principalmente, pela inquietude em busca de novos conhecimentos, que acaba por contagiar todos aqueles que estão a sua volta.

Aos amigos e colegas da Unidade de Endocrinologia Ginecológica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Em especial a Dr<sup>a</sup> Fabíola Satler e aos amigos e colegas de laboratório Débora Morsch, Ramon Bossardi, Polyana Maier e Sheila Lecke, por todos os ensinamentos, pelo apoio e colaboração no trabalho.

A equipe de apoio do nosso grupo de pesquisa, Míriam Sant'Helena e Natália Goulart, pelo auxílio e disponibilidade.

Um agradecimento especial ao Dr. Luis Paulo Gomes Mascarenhas e a Dr<sup>a</sup> Margaret C. S. Boguszewski pela imensa colaboração científica que dispuseram para o desenvolvimento do trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia UFRGS, por sempre atenderam as minhas necessidades da melhor maneira possível.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de estudar na instituição.

A Capes, pela bolsa de estudo.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

## RESUMO

A pubarca precoce (PP) é definida como o desenvolvimento de pêlos pubianos antes dos 8 anos de idade em meninas e 9 anos de idade em meninos. Embora a PP não interfira diretamente com os eventos da puberdade, algumas evidências sugerem que estas meninas tenham maior risco para desenvolver, mais tarde, a Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS). A 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 5 (17 $\beta$ HSD5) é a principal responsável pela conversão de androstenediona em testosterona. Variações no gene que codifica para essa enzima, em especial os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), podem estar relacionados com hiperandrogenismo e PCOS. A vitamina D, além dos efeitos sobre metabolismo ósseo, parece modular outras ações extra-esqueléticas, incluindo secreção e sensibilidade tecidual à insulina. A Vitamina D vem sendo associada com resistência insulínica e variantes do gene do receptor da vitamina D (VDR), vem sendo estudadas em populações de risco como no diabetes. No entanto, pouco se sabe sobre o envolvimento destes polimorfismos na PP.

Os objetivos do presente trabalho foram: Avaliar os níveis de 25-hidroxivitamina D; determinar a frequência dos polimorfismos FokI, BsmI, Apal e TaqI do gene do VDR e do SNP-71AG do gene da 17 $\beta$ HSD5; verificar se existe associação entre esses polimorfismos com variáveis antropométricas, metabólicas e hormonais em uma amostra de pacientes com PP e controles do sul do Brasil. Foram arroladas 36 meninas com PP e 197 controles saudáveis. As genotipagens foram realizadas por PCR em tempo real para os SNPs -71AG, BsmI e FokI e por PCR-RFLP para os SNPs Apal e TaqI.

O SNP -71 AG do gene da 17 $\beta$ HSD5 apresentou distribuição genotípica de 52,4% AA, 39,1% AG e 8,6% GG, sendo a frequência dos alelos A:G de 0,72:0,28. Analisando os dois grupos, verificamos uma maior frequência do alelo variante (G) no grupo de meninas com PP quando comparadas aos controles (0,37 e 0,26, respectivamente), no entanto sem diferença estatística ( $p=0,054$ ); não foram verificadas associações do polimorfismo com os dados clínicos e hormonais.

As meninas com PP apresentaram níveis séricos de 25(OH)D inferiores aos das meninas controles (18,08 $\pm$ 8,32 *versus* 21,27 $\pm$ 7,03;  $p=0,032$ ). Na análise dos polimorfismos, observou-se que o genótipo polimórfico GG do SNP Apal TG, apresentou uma frequência maior em PP (30,6%) do que nas controles (16,2%) (*Odds Ratio*: 2,269; 95% Intervalo de Confiança: 1,015 – 5,076;  $p=0,042$ ). Este genótipo foi também associado com níveis mais baixos de estradiol (35,30 (14,80 – 50,48) *versus* 12,22 (6,49 – 23,69);  $p=0,030$ ) e testosterona total (0,52 (0,39 – 0,84) *versus* 0,20 (0,11 – 0,47);  $p=0,009$ ) nas meninas com PP, mas não foi associado com os níveis de 25(OH)D. Por outro lado, verificou-se associação entre a presença dos polimorfismos TaqI TC (genótipo TC+CC) e BsmI GA (genótipo GA+AA) e níveis séricos de 25(OH)D mais elevados no grupo de meninas saudáveis (19,86 $\pm$ 7,16 *versus* 22,55 $\pm$ 6,69,  $p=0,007$ ; 19,53 $\pm$ 6,94 *versus* 22,88 $\pm$ 6,76,  $p=0,001$ , respectivamente).

Em conclusão, os dados deste estudo indicam que: 1) houve maior frequência do alelo variante G SNP -71 AG do gene da 17 $\beta$ HSD5, com uma associação limítrofe desse alelo com o diagnóstico clínico de PP; 2) o polimorfismo Apal TG associou-se com PP e parece estar modulando os processos esteroidogênicos nas meninas com PP; 3) houve uma interação entre os polimorfismos TaqI TC e BsmI GA e concentrações circulantes de vitamina D em meninas do sul do Brasil.

**Palavras-chaves:** pubarca precoce, vitamina D, receptor de vitamina D, 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 5, polimorfismos genéticos.

## ABSTRACT

Precocious pubarche (PP) is usually defined as the development of pubic hair before the age of 8 in girls and age of 9 in boys. Although the PP does not interfere directly in puberty events, some evidence suggests that these girls have higher risk for the development of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) at later ages. The Type 5 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase (17 $\beta$ HSD5) is the principal responsible for the conversion of androstenedione to testosterone. Variations in the gene encoding for this enzyme, especially Single Nucleotide polymorphisms (SNPs), may be related with hyperandrogenism, and PCOS. Besides the effects on bone metabolism, vitamin D appears to modulate other extra-skeletal actions, including secretions and tissue sensitivity to insulin. Vitamin D has been associated with insulin resistance and variants in the vitamin D receptor (VDR) gene, have been studied in populations at risk of Diabetes. However, little is known about these polymorphisms in the PP.

The aims of this work were: to evaluate the levels of the 25-hydroxyvitamin D; to determine the polymorphisms FokI, BsmI, Apal and TaqI in VDR gene and SNP -71AG in 17 $\beta$ HSD5 gene frequencies; to assess if exist association between this SNPs and anthropometric, metabolic and hormonal characteristics in patients with PP and controls of the southern Brazil. Were enrolled 36 girls with PP and 197 healthy controls. Genotypic analyzes were evaluated by Real Time for the SNPs -71AG, BsmI and FokI and by PCR-RFLP for the Apal e TaqI polymorphisms.

Genotype frequency for SNP -71 AG of the 17 $\beta$ HSD5 gene was 52.4% AA, 39.1% AG and 8.6% GG, A:G allelic frequency was 0.72:0.28. Analyzing both groups, higher frequency of the variant allele (G) in patient PP than controls (0.37 e 0.26, respectively) was found but without statistical difference ( $p=0.054$ ); there were no associations between this polymorphism and clinical and hormonal features.

PP girls have serum levels of 25(OH)D lower than those from control group ( $18.08\pm 8.32$  versus  $21.27\pm 7.03$ ;  $p=0.032$ ). The polymorphism analyze was observed that genotype GG of the SNP Apal TG showed a higher frequency in PP (30.6%) than controls (16.2%) (*Odds Ratio*: 2.269; 95% confidence interval: 1.015 – 5.076;  $p=0.042$ ). The same genotype was associated with lower estradiol ( $35.30$  (14.80 – 50.48) versus  $12.22$  (6.49 – 23.69);  $p=0.030$ ) and total testosterone levels ( $0.52$  (0.39 – 0.84) versus  $0.20$  (0.11 – 0.47);  $p=0.009$ ), in girls with PP. There were no association between this polymorphism and serum 25(OH)D. On the other hand, there was association between the presence of the polymorphisms TaqI TC (TC + CC genotype) and BsmI GA (GA + AA genotype) and higher serum 25(OH)D in the group of healthy girls ( $19.86 \pm 7.16$  versus  $6.69 \pm 22.55$ ,  $p = 0.007$ ;  $19:53 \pm 6.94$  versus  $22.88 \pm 6.76$ ,  $p = 0.001$ , respectively).

In conclusion, data from this study indicate that: 1) there was a higher frequency of the variant allele G of the SNP -71 AG of the 17 $\beta$ HSD5 gene, with a borderline association of this allele with the clinical diagnosis of PP; 2) Apal TG polymorphism is associated with PP and seems to modulate the processes steroidogenesis in girls with PP; 3) there was an interaction between the polymorphisms TaqI TC and BsmI GA and vitamin D concentrations in girls from southern Brazil.

**Key-words:** Precocious pubarche, vitamin D receptor, Type 5 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase, genetics polymorphisms.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Síntese e metabolismo da Vitamina D .....	21
Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de ação do Receptor de Vitamina D (VDR) .....	25
Figura 3: Representação esquemática do gene do Receptor de Vitamina D (VDR) e seus principais polimorfismos.....	27
Figura 4: PCR convencional com fragmentos de 714pb, em gel de agarose 1.5% corados com Gel Red. ....	39
Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 2,0% da reação de digestão com a enzima de restrição Apal.....	40
Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 2,0% da reação de digestão com a enzima de restrição Taql. ....	41
Figura 7: Genotipagem do polimorfismo FokI CT do gene do VDR por PCR em tempo real, ensaio de discriminação alélica.....	42
Figura 8: Genotipagem do polimorfismo BsmI GA do gene do VDR por PCR em tempo real, ensaio de discriminação alélica.....	43
Figura 9: Genotipagem do polimorfismo -71AG do gene da 17 $\beta$ HSD5 por PCR em tempo real, ensaio de discriminação alélica.....	43
Figura 10: Prevalência de hipovitaminose D na amostra total (A) e nas meninas com PP e controles (B).....	47
Figura 11: Frequência do SNP Apal TG do gene do VDR agrupado pela presença do alelo dominante.....	53
Figura 12: Níveis séricos de Testosterona total (A) e Estradiol (B) nas meninas com PP de acordo com os genótipos do SNP Apal TG agrupados pela presença do alelo dominante...56	
Figura 13: Níveis séricos de 25(OH)D, nas meninas do grupo controle, de acordo com o SNP Taql TC (A) e BsmI GA (B) agrupados pela presença do alelo recessivo .....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Métodos e valores de referência dos testes bioquímicos e hormonais.....	37
Tabela 2: Primers e sondas utilizados para a genotipagem dos polimorfismos do VDR e da 17 $\beta$ HSD5.....	41
Tabela 3: Condição das reações de PCR em tempo real, ensaio de discriminação alélica, para os polimorfismos do VDR e da 17 $\beta$ HSD5 .....	42
Tabela 4: Características clínicas e antropométricas nas meninas com Pubarca Precoce e Controles.....	46
Tabela 5: Características metabólicas e hormonais das meninas com Pubarca Precoce e Controles.....	48
Tabela 6: Frequência de deficiência de 25(OH)D em meninas com PP e Controles.....	48
Tabela 7: Frequência dos genótipos e alelos do SNP -71AG do gene 17 $\beta$ HSD5 de acordo com os grupos Total, Pubarca Precoce e Controle .....	49
Tabela 8: Análise das variáveis antropométricas e clínicas das meninas com Pubarca Precoce e controles estratificadas pelos genótipos do SNP 17 $\beta$ HSD5 -71AG agrupado para presença do alelo recessivo.....	50
Tabela 9: Análise das variáveis metabólicas e hormonais das meninas com Pubarca Precoce e controles estratificadas pelos genótipos do SNP 17 $\beta$ HSD5 -71AG agrupado para presença do alelo recessivo .....	51
Tabela 10: Frequência dos genótipos e alelos do SNP Apal TG do gene do VDR de acordo com os grupos Total, Pubarca Precoce e Controle.....	52
Tabela 11: Análise das variáveis antropométricas e clínicas das meninas com Pubarca Precoce e controles estratificadas pelos genótipos do SNP Apal TG agrupado para presença do alelo dominante.....	54
Tabela 12: Análise das variáveis metabólicas e hormonais das meninas com Pubarca Precoce e controles estratificadas pelos genótipos do SNP Apal TG agrupado para presença do alelo dominante.....	55
Tabela 13: Frequência dos genótipos e alelos dos SNPs TaqI TC e BsmI GA do gene do VDR de acordo com os grupos Total, Pubarca Precoce e Controles.....	57

Tabela 14: Análise das variáveis antropométricas e clínicas das meninas com Pubarca Precoce e controles estratificadas pelos genótipos do SNP TaqI TC agrupado para presença do alelo recessivo .....	58
Tabela 15: Análise das variáveis antropométricas e clínicas das meninas com Pubarca Precoce e controles estratificadas pelos genótipos do SNP BsmI GA agrupado para presença do alelo recessivo.....	59
Tabela 16: Frequência de deficiência de 25(OH)D, nas meninas do grupo Controle, de acordo com os genótipos dos SNPs TaqI TC e BsmI GA agrupados pela presença do alelo recessivo.....	60
Tabela 17: Análise das variáveis metabólicas e hormonais das meninas com Pubarca Precoce e controles estratificadas pelos genótipos do SNP TaqI TC agrupado para presença do alelo recessivo.....	62
Tabela 18: Análise das variáveis metabólicas e hormonais das meninas com Pubarca Precoce e controles estratificadas pelos genótipos do SNP BsmI GA agrupado para presença do alelo recessivo.....	63
Tabela 19: Frequência dos genótipos do SNP Fok CT na amostra Total, Pubarca Precoce e Controle.....	64
Tabela 20: Análise das variáveis antropométricas e clínicas das meninas com Pubarca Precoce e controles estratificadas pelos genótipos do SNP Fok I agrupado para presença do alelo recessivo.....	65
Tabela 21: Análise das variáveis metabólicas e hormonais das meninas com Pubarca Precoce e controles estratificadas pelos genótipos do SNP Fok I CT agrupado para presença do alelo recessivo.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

PP: Pubarca Precoce

HAC – NC: Hiperplasia Adrenal Congênita Forma não Clássica

PCOS: Síndrome dos Ovários Policísticos

IMC: Índice de Massa Corporal

RI: Resistência Insulínica

IGFs: Fatores de Crescimento Semelhantes à Insulina

IGF-1: Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1

DHEA: Dehidroepiandrosterona

S-DHEA: Sulfato de Dehidroepiandrosterona

TTG: Teste de Tolerância à Glicose

NIH: *National Institutes of Health*

17 $\beta$ HSD: 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase

17 $\beta$ HSD3: 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 3

17 $\beta$ HSD5: 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 5

SNP: Polimorfismo de Nucleotídeo Único

UVB: Ultravioleta-B

25(OH)D: 25-hidroxivitaminaD

25(OH)D<sub>3</sub>: 25-hidroxivitaminaD<sub>3</sub>

25(OH)D<sub>2</sub>: 25-hidroxivitaminaD<sub>2</sub>

1,25(OH)<sub>2</sub>D : 1,25-dihidroxivitaminaD

24(OH)D: 24-hidroxivitaminaD

DBP: Proteína Transportadora de Vitamina D

PTH: Paratormônio

VDR: Receptor de Vitamina D

HOMA: *Homeostasis Model Assessment*

HDL: Lipoproteína de Alta Densidade

LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade

NHANES III: *Third National Health and Nutrition Examination Survey*

QUICK: *Quantitative insulin sensitivity check index*

AUC: Área Sobre a Curva

SHBG: Proteína Transportadora dos Hormônios Sexuais

IAL: Índice de Androgênios Livres

RXR: Receptor X do ácido retinóico

ER $\alpha$ : Receptores alfa de estrogênio

17OHP: 17-hidroxiprogesterona

LH: Hormônio Luteinizante

FSH: Hormônio Folículo Estimulante

TSH: Hormônio Estimulante da Tireóide

T4: Tiroxina

TGO: Aspartato Aminotransferase

TGP: Alanina Aminotransferase

GH: Hormônio do Crescimento

A=0: Androstenediona

PN: Peso ao nascimento

PAS: Pressão Arterial Sistólica

PAD: Pressão Arterial Diastólica

CC: Circunferência da Cintura

CQ: Circunferência do Quadril

RCQ: Relação Cintura Quadril

pb: Pares de Base

BSA: *Bovine Serum Albumin*

RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

EHW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg

## SUMÁRIO

Resumo .....	5
Abstract .....	6
Lista de Figuras .....	7
Lista de Tabelas .....	8
Lista de Abreviaturas .....	10
Sumário .....	12
1. Introdução.....	14
1.1. Pubarca Precoce.....	14
1.2. 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (17 $\beta$ HSD).....	17
1.3. Vitamina D.....	19
1.4. Vitamina D e Insulina.....	22
1.5. Vitamina D, crianças e adolescentes.....	23
1.6. Receptor de Vitamina D (VDR).....	24
2. Justificativa .....	30
3. Objetivos.....	31
4. Materiais e Métodos.....	32
4.1. Delineamento .....	32
4.2. Pacientes .....	32
4.3. Avaliação Clínica e Antropométrica .....	33
4.4. Avaliação Hormonal e Metabólica .....	35
4.5. Análise Genotípica .....	38
4.6. Análise Estatística .....	44
4.7. Considerações Éticas.....	44
5. Resultados.....	45
5.1. Características clínicas e antropométricas das pacientes estudadas .....	45
5.2. Características metabólicas e hormonais das pacientes estudadas .....	47
5.3. Resultados do SNP -71AG do gene da 17 $\beta$ HSD5.....	49
5.4. Resultados dos SNPs do gene do Receptor da Vitamina D.....	52
6. Discussão .....	67
6.1. Caracterização da amostra de meninas com Pubarca Precoce e controles .....	67
6.2. Polimorfismo -71AG da 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 5 (17 $\beta$ HSD5).....	69
6.3. Polimorfismos do gene do Receptor da Vitamina D.....	70
7. Conclusões.....	76

8. Referências Bibliográficas.....	77
9. Anexos.....	84

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Pubarca Precoce

O desenvolvimento prematuro de pêlos pubianos, acompanhado ou não de pêlos axilares e odor apócrino, sem outros sinais de virilização ou desenvolvimento puberal, foi descrito pela primeira vez em 1941 por Wilkins e foi denominado pubarca prematura. A pubarca precoce ou prematura (PP) é definida como o desenvolvimento de pêlos pubianos antes dos 8 anos de idade no sexo feminino e 9 anos de idade no sexo masculino. Sua incidência é maior entre as meninas e usualmente surge após os 6 anos de idade (Ibanez et al. 2009).

Excluindo-se a hiperplasia adrenal congênita e tumores produtores de androgênios, a fisiopatologia da PP é atribuída ao aumento da secreção de androgênios pela zona reticular da glândula adrenal ocasionada pela sua maturação precoce, que leva a uma secreção de androgênios em níveis superiores aqueles esperados para a idade cronológica que a criança se encontra. Quando o quadro de desenvolvimento prematuro de pêlos pubianos ocorre de forma isolada, sem manifestações de outras características de desenvolvimento puberal, classifica-se como PP isolada ou idiopática. No entanto, a PP pode ser uma manifestação clínica inicial da puberdade precoce central, hiperplasia adrenal congênita forma não clássica (HAC-NC) e tumores produtores de androgênio, devendo-se excluir essas patologias (Auchus and Rainey 2004, Ibanez et al. 2009, Ghizzoni and Gasco 2010).

Tem sido proposto que a hipersecreção de androgênios pelas glândulas adrenais e ovarianas é causada por uma disfunção no processo da esteroidogênese nessas células, e que a presença de resistência insulínica (RI)/ hiperinsulinemia pode ser o gatilho para o desenvolvimento dessa característica. Essa hipótese é reforçada a partir da observação do aumento da secreção de androgênios em cultura de células tecais ovarianas e cultura de células adrenocorticais, quando estimuladas com insulina (Witchel 2006, Ibanez et al. 2009).

São escassos dados de prevalência de PP na população geral. Estima-se que sua prevalência seja de aproximadamente 2,8% entre as meninas brancas (Ghizzoni and Gasco

2010), sendo mais frequente em meninas de raça negra e de origem hispânica (DiMartino-Nardi 1998). Rosenfield e colaboradores demonstraram, através de dados provenientes do estudo do *Third National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES III), que a ocorrência de desenvolvimento de pêlos pubianos antes dos 8 anos de idade é incomum na população total (0,6%) de índice de massa corporal (IMC) normal, e que se eleva a 3,0% quando observada somente nas meninas negras de IMC normal. Ao analisar a frequência entre as meninas que possuem sobrepeso/obesidade é descrito que 2,1% da população total apresenta desenvolvimento de pêlos pubianos antes dos 8 anos de idade (Rosenfield, Lipton and Drum 2009).

Apesar da afirmação de que a PP possa ser um processo benigno e que não interfere nos eventos da puberdade, por não modificar o padrão de secreção de gonadotrofinas, as crianças acometidas por essa patologia podem apresentar aumento na velocidade de crescimento com leve avanço na idade óssea, mas sem efeitos negativos na estatura final (Ibanez et al. 1992, Accetta et al. 2004). Além de, na grande maioria dos casos, apresentarem níveis de androgênios, como dehidroepiandrosterona (DHEA), sulfato de dehidroepiandrosterona (S-DHEA), androstenediona e testosterona, moderadamente aumentados para a idade cronológica, mas compatíveis com o estágio de desenvolvimento pubianos. Em alguns casos, os níveis de androgênios são compatíveis com a idade cronológica, sugerindo um aumento na sensibilidade periférica aos androgênios (Witchel 2006, Eyzaguirre et al. 2009, Ibanez et al. 2009, Ghizzoni and Gasco 2010).

No entanto, alguns estudos têm demonstrado que meninas que possuem histórico de PP apresentam uma maior incidência de oligomenorréia/amenorréia, hiperandrogenismo e Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS). Foi demonstrado que até 45% de meninas pós-puberais, com desenvolvimento de pêlos pubianos antes dos 8 anos de idade, apresentam características clínicas e hormonais compatíveis com o diagnóstico de PCOS (Ibanez et al. 1993), além de RI, menor relação glicose/insulina, alterações nos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) (Vuguin et al. 1999, Evliyaoglu et al. 2007) e aumento nos níveis de Leptina (Teixeira et al. 2004, Ibanez et al. 2000).

Algum grau de resistência insulínica é evento comum durante a puberdade. Estudo longitudinal com meninas espanholas com PP mostraram tendência à hiperinsulinemia mesmo com teste de tolerância à glicose (TTG) normal; dislipidemia durante a puberdade e evidências laboratoriais de RI e disfunção ovariana no período pós-menarca (Ibanez et al. 2001). Em estudo avaliando meninas do sul do Brasil com idade máxima de 10 anos, foi verificada uma grande prevalência de sobrepeso/obesidade em meninas com PP, característica que pode contribuir para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos em idade mais avançada (Accetta et al. 2004).

Em 2011, Ibanez e colaboradores demonstraram que o tratamento com metformina (uma droga que aumenta a sensibilidade periférica à insulina) por quatro anos, em amostra de meninas com PP e baixo peso ao nascer, retarda o evento da menarca em aproximadamente um ano, reduz a adiposidade total, visceral e hepática, além de melhorar o perfil endócrino metabólico quando comparadas a meninas com PP e baixo peso ao nascer que não receberam tratamento (Ibanez et al. 2011).

Além disso, a condição nutricional parece ser um regulador no processo de maturação das glândulas adrenais. Alguns estudos indicam que crianças nascidas prematuras ou com baixo peso apresentam níveis de androgênios circulantes mais elevados e, da mesma forma, aquelas que ganham peso rapidamente durante a infância e apresentam sobrepeso ou obesidade, são mais propensas a desenvolver PP (Ong et al. 2004, Neville and Walker 2005).

Em meninas com PP, aquelas com baixo peso ao nascer podem ter a menarca cerca de 8-10 meses antes, do que as que nascem com peso normal (Ibanez et al. 2009). No entanto, esses dados não são conclusivos; em estudo de coorte de crianças holandesas nascidas pequenas para idade gestacional foi demonstrado que apenas 2,2% dessas eram acometidas pela PP. Em estudo com PP italianas, verificou-se que todas possuíam peso normal ao nascimento; e em meninas com PP finlandesas o peso ao nascimento foi similar ao de meninas que não apresentaram desenvolvimento de pêlos pubianos antes dos 8 anos de idade (Utriainen, Voutilainen and Jaaskelainen 2009, Ghizzoni and Gasco 2010).

Como já referido, meninas com PP podem ter um risco maior para desenvolver PCOS. Por outro lado, em estudo caso-controle que analisou filhas de mulheres com PCOS e filhas de mulheres saudáveis, durante a infância e durante a fase pré-puberal, foi demonstrado que as filhas de mulheres com PCOS possuem, no período peripuberal maiores níveis de androgênios (S-DHEA), insulina e idade óssea avançada em aproximadamente 8 meses quando comparadas ao grupo controle. E que cerca de 30% das meninas filhas de mulheres com PCOS apresentaram evidências bioquímicas de adrenarca exagerada (Maliqueo et al. 2009). Outros pesquisadores demonstraram que a PP pode estar associada a variações genéticas em receptores de androgênios (Ibanez et al. 2003). Esses achados sugerem que a presença de hiperandrogenismo nos casos de PP e PCOS pode ser, em parte, geneticamente determinada.

## 1.2. 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (17 $\beta$ HSD)

A 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (17 $\beta$ HSD) é uma enzima envolvida na formação de esteróides sexuais ativos, promovendo a catálise na formação de todos os estrogênios e androgênios que requerem a presença de um grupamento hidroxila na posição 17 $\beta$  do núcleo esteróide.

Já na década de 60, começaram a ser realizados estudos que comprovaram que a atividade dessa enzima não está presente somente em tecidos esteroidogênicos clássicos, mas também é encontrada em inúmeros tecidos periféricos, como tecido adiposo (Bleau, Roberts and Chapdela 1974), endométrio (Tseng, Stolee and Gurdipe 1972), (Casey, Macdonald and Andersson 1994), pele e mucosa vaginal (Weinstei, Frost and Hsia 1968), hemácias (Jacobsoh and Hochberg 1968) e células cancerígenas mamárias (Poulin et al. 1989) e prostáticas (El-Alfy et al. 1999).

A interconversão de estradiol em estrona e de androstenediona em testosterona são catalizadas por distintas isoenzimas da 17 $\beta$ HSD, que diferem em relação ao tecido alvo, substratos e co-fatores preferenciais, além das propriedades catalíticas (Andersson, Russell and Wilson 1996).

Como mencionado, a biossíntese de testosterona requer a atividade androgênica da 17 $\beta$ HSD e, em especial, das isoformas tipo 3 (17 $\beta$ HSD3) e tipo 5 (17 $\beta$ HSD5), que catalisam preferencialmente a reação de redução da androstenediona em testosterona (Dufort et al. 1999). A 17 $\beta$ HSD3 é principalmente encontrada nos testículos e é essencial para a diferenciação e desenvolvimento sexual (Mendonca et al. 1999, George et al. 2010), enquanto que a 17 $\beta$ HSD5 é amplamente distribuída, sendo encontrada nos ovários (Luu-The et al. 2001), glândulas adrenais, testículos, fígado, rins, pulmões, placenta, cérebro e próstata (Dufort et al. 1999, Mendonca et al. 1999, Qin, New and Cheng 1993, Steckelbroeck et al. 2001), desempenhando um importante papel na síntese de androgênios femininos (Luu-The et al. 2001). A expressão dessas enzimas também é observada no tecido adiposo, sendo a maior contribuição feita pelo tecido adiposo subcutâneo, e nas glândulas adrenais (MacKenzie et al. 2008).

A 17 $\beta$ HSD5, também conhecida por AKR1C3, pertence à superfamília das enzimas aldo-ceto redutases, e é a principal responsável pela reação de redução da androstenediona em testosterona nas células tecais ovarianas e nas glândulas adrenais (Luu-The et al. 2001, Nakamura et al. 2009). O gene que codifica a 17 $\beta$ HSD5 (*HSD17B5*) (ID: 8644) é composto por nove éxons, abrangendo 16Kb e está localizado no cromossomo 10p14,15 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8644>). O gene *HSD17B5* tem sido alvo de estudos que

buscam avaliar possíveis associações dos níveis de expressão e de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) com características clínicas e/ou laboratoriais de hiperandrogenismo, PCOS e PP.

Em estudo de imunohistoquímica com tecido ovariano humano, foi verificada a presença da 17 $\beta$ HSD5 nas células da teca ovarianas, responsáveis pela produção de androgênios nas mulheres, enquanto que as células da granulosa ovariana, que produzem estrogênios e progesterona, não foram marcadas pelo anticorpo para 17 $\beta$ HSD5 (Luu-The et al. 2001). Esses dados enfatizam o papel dessa enzima na produção de androgênios pelo sexo feminino.

O gene *HSD17B5* também é expresso em tecido adiposo (MacKenzie et al. 2008, Blouin et al. 2009) e essa expressão foi acompanhada por aumento significativo na conversão de androstenediona para testosterona no tecido adiposo subcutâneo (Blouin et al. 2009).

Dentre os mais de 330 polimorfismos presentes nesse gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>), em 2006 foi identificado um polimorfismo funcional na região promotora (posição -71, troca de A por G), registrado pelo rs3763676 (Qin et al. 2006), que tem sido focado como um possível fator para alterações na expressão gênica e ter relação com os fenótipos de hiperandrogenismo, PCOS e PP. Isso se deve ao fato desse polimorfismo se localizar próximo ao sítio de iniciação da transcrição de gene e a poucos pares de base do local de ligação aos elementos responsivos da região promotora do gene *HSD17B5* (Qin and Rosenfield 2005).

A associação entre este polimorfismo e PCOS é ainda controversa. Um estudo demonstrou uma maior frequência do alelo G e do genótipo homozigoto para esse alelo em pacientes com PCOS comparadas ao grupo controle. Além disso, o alelo G em homozigose pode contribuir com aproximadamente 20% do nível de testosterona plasmático nas pacientes com PCOS, embora não tenha sido demonstrada diferença estatística entre os níveis de testosterona e os genótipos desse SNP (Qin et al. 2006). Nesse mesmo estudo, foi verificado em ensaio *in vitro*, que a presença do alelo G está associada com o aumento da atividade da região promotora do gene, sugerindo que o SNP-71AG pode estar envolvido no controle da expressão gênica do *HSD17B5* devido à maior afinidade do alelo variante com os fatores de transcrição do gene.

Contudo, um grupo de pesquisadores que buscou replicar os dados prévios existentes na literatura acerca do SNP-71AG da região promotora do gene *HSD17B5* com o risco para PCOS não obteve confirmação dos dados. Ao avaliar os SNPs rs3763676 (SNP - 71AG), rs12529, rs17396032, rs2518049 e rs1937841, em 287 PCOS e 187 controles, não

foi encontrada qualquer associação entre os polimorfismos isolados, bem como de haplótipos, e o diagnóstico de PCOS ou níveis de testosterona (Goodarzi et al. 2008).

Em outro estudo que avaliou mulheres gregas com PCOS e controles, não foi observada associação entre o alelo G do SNP-71AG do gene *HSD17B5* com o diagnóstico de PCOS, mas a presença desse alelo foi associada com o aumento dos níveis de testosterona plasmática e diminuição da relação androstenediona/testosterona nas pacientes com a patologia, sugerindo que essa variação não é o principal componente do mecanismo molecular patogênico de PCOS, mas que pode contribuir para a hiperandrogenemia nessas pacientes (Marioli et al. 2009). Recentemente, em mulheres PCOS e controles chinesas, esse polimorfismo se mostrou bastante raro (Ke et al. 2010).

Na literatura, apenas um estudo buscou avaliar a distribuição genotípica do SNP-71AG, e de haplótipos envolvendo esse SNP, em meninas com PP. No entanto, nenhum genótipo do SNP-71AG ou haplótipo, envolvendo mais três polimorfismos avaliados no estudo (rs12529, rs7741, rs12387), demonstrou associação com PP, hiperandrogenemia ou hiperandrogenismo (Petry et al. 2007).

Em 2010, uma pesquisa de base populacional realizada com 24.341 mulheres americanas, arroladas do *Nurses' Health Study* e *Women's Genome Health*, que objetivou avaliar a associação de 278 genes (incluindo o gene *HSD17B5*), compreendendo 336.108 SNPs, com a idade da menarca e da menopausa natural, não encontrou associação significativa entre SNPs do gene que codifica a  $17\beta$ HSD5 e as características de interesse do estudo (He et al. 2010).

### 1.3. Vitamina D

A vitamina D, é um hormônio esteróide que pode ser obtido através da dieta e, principalmente, através da exposição solar. A expressão "Vitamina D" engloba os dois tipos descritos desse hormônio, a Vitamina D<sub>2</sub> e a Vitamina D<sub>3</sub>. Ambas podem ser obtidas a partir da dieta, sendo absorvidas pelo organismo através de sua incorporação em quilomicrons. Porém a Vitamina D<sub>3</sub>, que também é sintetizada na pele através da exposição aos raios ultravioleta-B (UVB), é a maior representante desse esteróide (figura 1) (Holick and Deluca 1974, Dusso, Brown and Slatopolsky 2005, Holick 2007, Palomer et al. 2008, Querales et al. 2010).

Durante a exposição aos raios UVB, ocorre na pele a conversão do 7-deidrocolesterol em Pré-vitamina D<sub>3</sub>, que é rapidamente convertida em Vitamina D<sub>3</sub>, em

um processo dependente de calor. Exposição solar excessiva promove a degradação da Pré-vitamina D<sub>3</sub> e da Vitamina D<sub>3</sub> em subprodutos inativos, sendo considerado um mecanismo de proteção contra a possível intoxicação (figura 1) (Holick and Deluca 1974, Dusso et al. 2005, Holick 2007, Palomer et al. 2008, Querales et al. 2010).

No fígado, ocorre a reação de hidroxilação no carbono 25 da Vitamina D, catalisada pela enzima 25-hidroxilase, que a converte em 25-hidroxivitaminaD (25(OH)D), principal metabólito circulante desse hormônio. A segunda reação de hidroxilação ocorre predominantemente no tecido renal, por ação da 1 $\alpha$ -hidroxilase, que converte a 25(OH)D no metabólito ativo 1,25-dihidroxivitaminaD (1,25(OH)<sub>2</sub>D) (figura 1) (Holick and Deluca 1974, Dusso et al. 2005, Holick 2007, Palomer et al. 2008, Querales et al. 2010).

No tecido renal, a 25(OH)D pode sofrer a ação da enzima 24-hidroxilase, dando origem a 24-hidroxivitaminaD (24(OH)D), produto metabolicamente inativo que é catabolizado. Uma vez sintetizada, a 1,25(OH)<sub>2</sub>D é transportada pela circulação, através de sua ligação a Proteína Transportadora de Vitamina D (DBP), aos órgãos e tecidos onde irá exercer suas funções. A produção da 1,25(OH)<sub>2</sub>D é principalmente regulada pelo Paratormônio (PTH) e pelos níveis séricos de cálcio e fósforo (figura 1) (Holick and Deluca 1974, Dusso et al. 2005, Holick 2007, Palomer et al. 2008, Querales et al. 2010).

A principal função da Vitamina D no organismo é manter as concentrações intra e extracelulares de cálcio e fósforo em concentrações fisiológicas adequadas. Para isso atua principalmente a nível intestinal, aumentando a absorção desses íons, e em menor proporção, a nível ósseo estimulando o processo de ressorção óssea (figura 1) (Holick and Deluca 1974, Dusso et al. 2005, Holick 2007, Palomer et al. 2008, Querales et al. 2010).

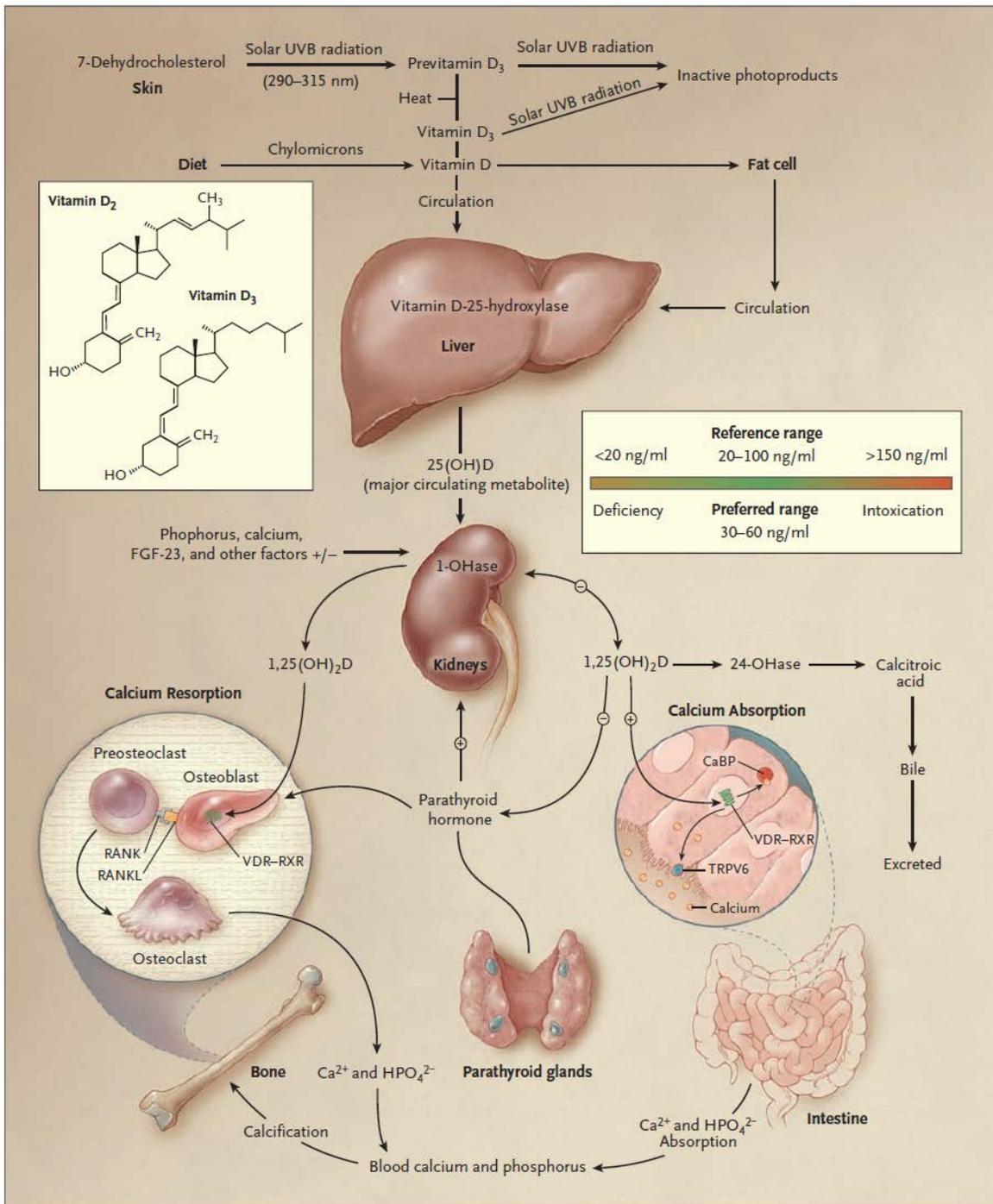


Figura 1: Síntese e metabolismo da Vitamina D (Holick, 2007).

#### 1.4. Vitamina D e Insulina

A Vitamina D atua em diversos órgãos e tecidos, desempenhando funções que vão além de seu clássico envolvimento no metabolismo do cálcio. Algumas evidências demonstram um importante papel da Vitamina D sobre a secreção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas, e tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo* foi verificado que esse hormônio é essencial para a liberação de níveis normais de insulina em resposta à glicose e para a manutenção da tolerância à glicose (Pittas et al. 2007, Palomer et al. 2008, Alvarez and Ashraf 2010, Takiishi et al. 2010).

A ação da Vitamina D sobre as células  $\beta$ -pancreáticas pode ser mediada pela ligação da sua forma ativa ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ) ao receptor de Vitamina D (VDR), ou, através da conversão da  $25(\text{OH})\text{D}$  em  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  pela ação da  $1\alpha$ -hidroxilase presente nas células  $\beta$ -pancreáticas (Bland et al. 2004, Pittas et al. 2007, Pittas and Dawson-Hughes 2010). Em estudo *in vitro*, com linhagem de células  $\beta$ -pancreáticas, foi demonstrado que esse esteróide promove a elevação da concentração do cálcio intracelular via canais cálcio voltagem-dependentes (Palomer et al. 2008, Querales et al. 2010). Como consequência, o principal mecanismo de ação da Vitamina D sobre a síntese e liberação por exocitose da insulina, está possivelmente relacionado com a ativação de endopeptidases cálcio-dependentes que promovem a clivagem que facilita a conversão da molécula de pró-insulina em insulina. Além disso, a elevação do cálcio citoplasmático é importante no metabolismo da glicose nas células  $\beta$ -pancreáticas, o qual desempenha relevante papel na sinalização da concentração de glicose circulante (Boucher 1998, Palomer et al. 2008).

A ampla influência da Vitamina D sobre mecanismos de homeostase da glicose são explicados não só pela ampla distribuição de seu receptor pelo organismo, incluindo músculo esquelético e tecido adiposo, e pela expressão da  $1\alpha$ -hidroxilase no tecido pancreático, mas também, pela presença do elemento responsivo a Vitamina D no gene da Insulina. Além disso, a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  melhora a sensibilidade insulínica por ativar a transcrição do gene do receptor de insulina e ativar os Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomo (PPAR- $\delta$ ), um fator de transcrição atuante no metabolismo de ácidos graxos no músculo esquelético e no tecido adiposo (Alvarez and Ashraf 2010, Pittas and Dawson-Hughes 2010).

A Vitamina D também pode afetar a secreção e sensibilidade à insulina de forma indireta, devido a sua função de regulação das concentrações extracelulares de cálcio e do fluxo desse íon através das membranas plasmáticas das células  $\beta$ -pancreáticas e tecidos alvo de ação insulínica (Pittas and Dawson-Hughes 2010).

Alvarez e colaboradores observaram que os níveis de 25(OH)D estão associados com a sensibilidade à insulina, e verificaram que existe diferença nos níveis desse hormônio entre os grupos étnicos estudados, sendo mais elevados nas mulheres de origem europeia do que nas africanas. Assim, esse esteróide poderia estar contribuindo para os distintos padrões de sensibilidade insulínica encontrado entre as diferentes populações (Alvarez et al. 2010).

Já mulheres obesas apresentam níveis de 25(OH)D mais baixos, quando comparadas às mulheres magras, bem como apresentam um quadro desfavorável nos parâmetros metabólicos e hormonais e HOMA-IR mais elevado. Após serem submetidas a uma dieta de baixa caloria, com conseqüente perda de 10% do peso, foi observada uma melhora nos níveis de vitamina D, insulina e HOMA-IR, sendo o aumento da 25(OH)D associado a redução dos níveis de insulina e HOMA-IR, mas não com a perda de peso. Os autores sugerem que a melhora no metabolismo da insulina e da glicose pode ser determinado de forma mais importante pelo aumento dos níveis de vitamina D, do que pela perda de peso (Tzotzas et al. 2010).

Muitos estudos buscam avaliar o *status* de vitamina D e suas correlações em amostra de indivíduos acometidos por Diabetes. Esses sugerem que a vitamina D possa ter um papel na patogênese dessa doença, justamente pelo conhecimento de sua atuação no metabolismo da glicose/insulina. Pesquisadores sugerem que a hipovitaminose D possa ser um fator de risco para o desenvolvimento de quadros de Diabetes (Palomer et al. 2008). Em uma revisão sistemática publicada em 2007, foi demonstrado que não existe um consenso entre os estudos que procuraram avaliar a associação do status de Vitamina D e Diabetes ou fenótipos associados à doença, como intolerância à glicose, secreção de insulina e RI. Alguns estudos demonstraram associação da hipovitaminose D com intolerância à glicose e/ou risco para Diabetes, enquanto outros não confirmam esses resultados (Pittas et al. 2007). Esses dados permanecem contraditórios segundo revisões mais recentes da literatura (Song and Manson 2010, Pittas and Dawson-Hughes 2010).

### **1.5. Vitamina D, crianças e adolescentes**

Não existe um consenso sobre os níveis ideais de vitamina D circulante. No entanto, através de estudos que avaliaram as relações entre níveis séricos de 25(OH)D, PTH e absorção de cálcio intestinal, pode-se observar que a maioria dos pesquisadores adotaram como valores de referência aqueles revisados por Holick em 2007. São referidos como status de deficiência de 25(OH)D níveis menores que 20ng/mL (50nmol/L), insuficiência de

20 a 29 ng/mL (52 a 72 nmol/L) e, como suficiente, níveis séricos iguais ou maiores que 30ng/mL (75nmol/L) (Holick 2007).

Existem vários estudos que buscaram analisar os níveis de 25(OH)D em população pediátrica e adolescente. Dados do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) publicados em 2008 e 2009, revelaram que 61% da população pediátrica americana apresenta níveis de Vitamina D entre 15 e 29ng/mL, e que esses índices de deficiência aumentaram ao longo dos anos (Melamed and Kumar 2010).

A prevalência de deficiência de Vitamina D é similar em várias regiões do mundo. Na Índia chamou a atenção o fato de que 81,5% das crianças saudáveis da zona rural e urbana apresentaram deficiência em 25(OH)D (Harinarayan et al. 2008). Na Noruega, ao se avaliar mães e filhos imigrantes do Paquistão, Turquia e Somália, foi observado que 40% das crianças apresentavam níveis séricos de Vitamina D abaixo de 20ng/mL (Madar, Stene and Meyer 2009). Somam-se a esses dados, o achado de que 39% das crianças, entre 4 e 5 anos de idade, do norte da Jordânia também apresentam deficiência desse esteróide (Gharaibeh and Stoecker 2009). Dados de países da América do Sul são escassos, porém um estudo realizado com indivíduos brasileiros revelou que 62,1% de 136 adolescentes magros, entre 16 e 20 anos, da zona rural do estado de São Paulo apresentam insuficiência de Vitamina D, sendo que entre as meninas a frequência é de 60,6% (Peters et al. 2009).

Arabi e colaboradores descreveram que em países em desenvolvimento a hipovitaminose D atinge de 3 a 74% da população pediátrica e adolescente. Além disso, os principais fatores de risco para a ocorrência dos baixos níveis de Vitamina D nesses países são pertencer ao sexo feminino e a grupos de idade específicos, como neonatos, idade pré-escolar ou velhice. A obesidade também pode ser um fator que predispõem a hipovitaminose D (Arabi, El Rassi and Fuleihan 2010).

## **1.6. Receptor de Vitamina D (VDR)**

O VDR foi descrito em 1974, em mucosa intestinal de modelo animal, por Brumbaugh e Hausslere, e pertence à família dos receptores de hormônios esteróides/tireoideos (Brumbaugh and Haussler 1974). Trata-se de um receptor intracelular cuja proteína é composta por três regiões distintas: um domínio N-terminal DNA-ligante com dois dedos de zinco, um domínio ativo C-terminal ligante e uma região extensa e não estruturada que liga os dois domínios funcionais da proteína (região de dobradiça). A região C-terminal é a mais complexa e possui 12 cadeias  $\alpha$ -hélice. Coletivamente esses domínios do VDR criam uma macromolécula receptiva aos níveis fisiológicos de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, capaz

de direcionar a maquinaria de regulação celular para grupos de genes que produzem as proteínas necessárias aos efeitos desse hormônio (Pike and Meyer 2010).

O mecanismo de ação do VDR baseia-se no reconhecimento de uma sequência específica na fita de DNA, chamada de elemento responsivo à Vitamina D. Esse sítio de ligação, existente em inúmeros genes, permite o reconhecimento e acoplamento do VDR, após sua heterodimerização com receptor X do ácido retinóico (RXR) (Mangelsdorf and Evans 1995, Haussler et al. 1998), que por sua vez irá estimular ou inibir transcrição dos genes de interesse (figura 2). Uma de suas principais ações é a estimulação da transcrição de proteínas transmembrana formadoras de canais de cálcio, promovendo a elevação da concentração intracelular desse íon, via canais de cálcio voltagem-dependentes (Sergeev and Rhoten 1995).

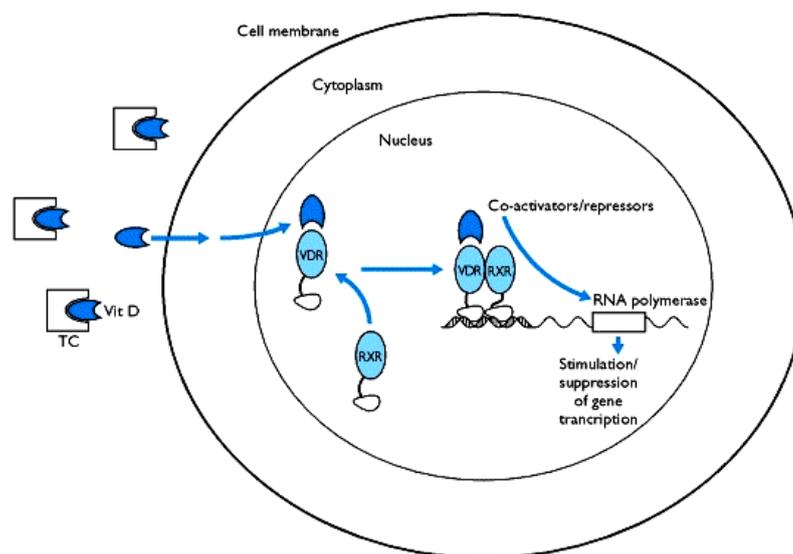


Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de ação do Receptor de Vitamina D (VDR).

Desde a década de 80 já é conhecido que os níveis de expressão do gene do VDR são regulados pela  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ . Hoje soma-se a esse conhecimento que a regulação do VDR também é feita por uma grande variedade de outros hormônios, incluindo o PTH, Ácido Retinóico e glicocorticóides (Pike and Meyer 2010). O VDR é expresso em vários tecidos, desde aqueles envolvidos nos mecanismos de homeostase do cálcio até aqueles

que são envolvidos nos processos de regulação do metabolismo da glicose, como músculo e células  $\beta$ -pancreáticas (Palomer et al. 2008).

Há alguns anos vêm se estudando o papel de regulação exercida pelo VDR sobre a biossíntese de hormônios esteróides, em especial dos estrogênios. Muitos estudos têm demonstrado que a Vitamina D pode regular a expressão e atividade de enzimas chaves envolvidas na biossíntese desses hormônios. Ao que parece, a ativação do VDR pela ligação da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  promove um aumento da expressão da aromatase (enzima que catalisa a síntese de estrogênios a partir de um precursor androgênico) em cultura celular de osteoblastos humanos e em modelos animais bloqueados para o VDR (Kinuta et al. 2000, Enjuanes et al. 2003, He, Cheng and Xie 2010).

Porém, de forma interessante, em 2010 foi demonstrado em estudo com modelos *in vitro* e *in vivo* que a vitamina D diminui a expressão da aromatase em células mamárias humanas e pré-adipócitos de ratos e, que promove uma modesta elevação na expressão da aromatase em tecido ovariano cancerígeno (Krishnan, Swami and Feldman 2010). Esses dados em conjunto sugerem que a Vitamina D possa regular a expressão da aromatase de forma seletiva, de acordo com o tecido de atuação hormonal e, geram a hipótese de que esse hormônio possa estar auxiliando no desenvolvimento de quadros de hiperandrogenismo.

O gene que codifica o VDR (ID: 7421) é composto por 11 éxons que, somados aos íntrons do gene, se expandem por aproximadamente 75Kb e está localizado no cromossomo 12q13.11 (Figura 3) (Miyamoto et al. 1997). De acordo com o *Gene Bank*, o VDR possui mais de 900 SNPs, incluindo as regiões codificantes e não codificantes do genoma (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). No entanto, os polimorfismos mais estudados desse gene estão localizados próximos a região 3' não transcrita do gene (3' UTR), que é reconhecidamente uma região envolvida na modulação da expressão gênica, especialmente através da regulação da estabilidade do mRNA e da eficiência de tradução protéica (Ogunkolade et al. 2002, Valdivielso and Fernandez 2006, Palomer et al. 2008).

Na literatura, a maioria dos trabalhos que se propuseram a estudar SNPs do VDR avaliaram os polimorfismos FokI (rs2228570), BsmI (rs1544410), ApaI (rs7975232) e TaqI (rs731236) (Figura 3). Essas regiões polimórficas do VDR são reconhecidas na literatura pelo nome da enzima de restrição que cliva a região variante.

O SNP FokI CT está localizado no éxon 2 e corresponde a troca de uma Citosina (C) por uma Timina (T). Trata-se de um polimorfismo *missence* (quando altera o aminoácido sintetizado), onde sua ocorrência gera a formação de um códon de iniciação (ATG) suplementar a uma distância de três códons do sítio de iniciação natural do gene, traduzindo proteínas de tamanhos distintos, de 424 aminoácidos na presença do alelo T e de 427 aminoácidos na presença do alelo C (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). Segundo alguns

autores, a presença desse SNP pode alterar as propriedades funcionais do receptor e, alguns estudos demonstram que a forma protéica curta possui maior atividade de transcrição que a forma longa (Valdivielso and Fernandez 2006, McGrath et al. 2010).

O polimorfismo BsmI GA localiza-se no intron 8 e corresponde a troca de uma Guanina (G) por uma Adenina (A). O SNP ApaI TG encontra-se nesse mesmo intron, e corresponde a troca de uma Timina (T) por uma Guanina (G) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

No éxon 9 é encontrado o SNP TaqI TC, que corresponde a troca de uma Timina (T) por uma Citosina (C). É considerado um polimorfismo silencioso, pois mesmo na sua ocorrência o aminoácido formado no códon correspondente (códon 352) é uma Isoleucina (ATT ou ATC) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

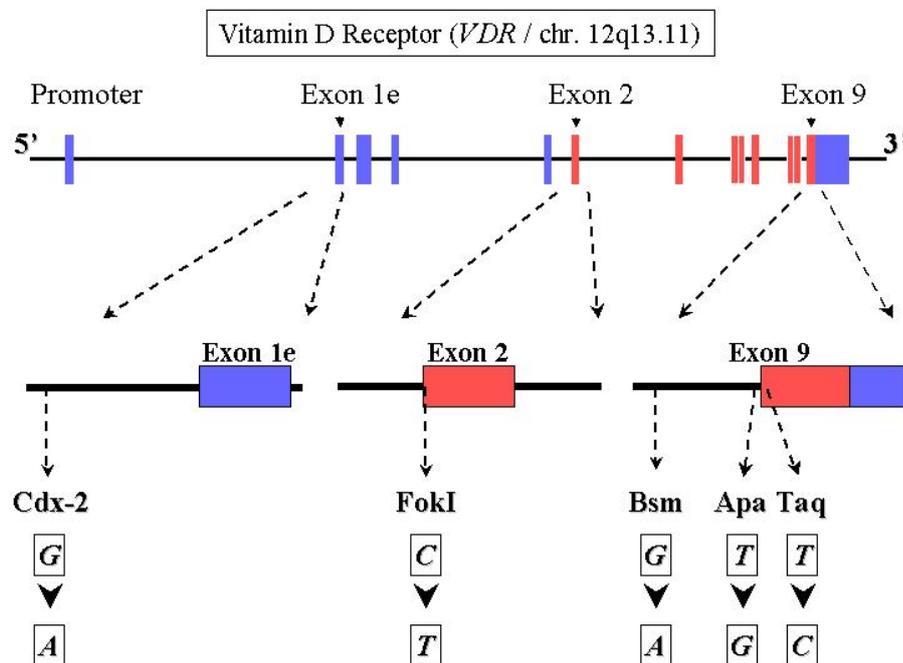


Figura 3: Representação esquemática do gene do Receptor de Vitamina D (VDR) e seus principais polimorfismos. Fonte: [www.genomos.eu/history](http://www.genomos.eu/history).

Recentemente foi publicada uma revisão sistemática da literatura sobre estudos que avaliaram os níveis séricos de 25(OH)D e sua associação com SNPs relacionados a esse esteróide, como os da DBP e do VDR. Como resultado, de 5 artigos que avaliaram 25 SNPs

do VDR, foi verificado que o alelo de menor frequência (alelo T) do SNP FokI CT foi associado com níveis mais elevados de 25(OH)D (McGrath et al. 2010).

Com a utilização cada vez mais frequente da biologia molecular na investigação da fisiopatogenia das doenças, há grande interesse em identificar genes relacionados com os níveis de secreção e de resistência insulínica e hiperandrogenismo. Com esse foco, alguns pesquisadores têm objetivado avaliar SNPs do VDR em relação a esses parâmetros.

Em um estudo de coorte realizado com indivíduos asiáticos de Bangladesh com idades entre 42 e 50 anos, o SNP Apal TG (genótipo TT) foi associado a maiores níveis de secreção de insulina (Hitman et al. 1998). Em outro estudo que analisou essa mesma coorte, foi demonstrado que o SNP TaqI TC pode ser um preditor independente para os níveis de secreção de insulina, e que a presença do genótipo CC associa-se a maiores níveis de secreção desse hormônio (Ogunkolade et al. 2002). Somando-se a esses achados, o SNP BsmI GA (genótipo AA) foi associado com maiores níveis de Peptídeo-C pós-prandial em pacientes caucasianos húngaros (Alvarez and Ashraf 2010). Por outro lado, em estudo envolvendo sujeitos brasileiros com Diabetes Mellito tipo 1, o SNP BsmI GA não foi associado a nenhum parâmetro clínico ou metabólico analisado. Nesse mesmo estudo foi verificado que aqueles indivíduos com a presença do alelo T (genótipos CT e TT) do SNP FokI CT possuem níveis de Peptídeo-C em jejum mais baixos, porém sem diferença estatística ( $p=0.074$ ) (Mory et al. 2009).

No que se refere aos parâmetros de avaliação de RI e metabolismo da glicose, um estudo transversal com sujeitos americanos caucasianos, idade média de 70 anos, revelou associação dos SNPs Apal TG (genótipo GG) com maiores níveis de glicose em jejum e de intolerância à glicose, e do SNP BsmI GA (genótipo GG) com valores de HOMA-IR mais elevados. Além disso, os autores verificaram uma maior frequência do genótipo GG do SNP Apal TG, nos indivíduos com Diabetes Mellito tipo 2 quando comparados a sujeitos saudáveis, porém essa diferença não foi significativa ( $p=0,058$ ) (Oh and Barrett-Connor 2002). Somando-se a esses achados, um estudo de coorte com soldados alemães saudáveis demonstrou que, naqueles indivíduos que realizavam pouca atividade física semanal, foi encontrada uma associação do SNP BsmI GA (genótipo AA) com maiores níveis de glicose em jejum. Esses resultados não foram observados para o grupo de indivíduos que não realizavam atividade física regular (Ortlepp et al. 2003).

Embora estudos venham demonstrando relações entre vitamina D, RI e desenvolvimento de PCOS, são inexistentes estudos que busquem avaliar a associação desse hormônio e de genes relacionados a ele, como o gene do VDR e da DBP, com o fenótipo clínico de PP.

Por outro lado, são encontrados na literatura dois estudos que avaliaram os polimorfismos do VDR em amostra de pacientes com PCOS. O primeiro, em uma população

de mulheres iranianas, demonstrou associação entre o SNP Apal TG e PCOS, sugerindo que a presença em homozigose do alelo variante (GG) pode conferir risco para PCOS independente da idade e do IMC. Nesse mesmo estudo, foi verificado que o genótipo homozigoto dominante (CC) para o SNP FokI CT pode conferir risco para aumento dos níveis séricos de insulina e RI; ademais os SNPs, BsmI GA e TaqI TC (genótipos GG e TT, respectivamente) foram associados com níveis séricos de 25(OH)D mais elevados (Mahmoudi 2009).

Posteriormente, um estudo que arrolou 56 mulheres com PCOS, observou uma associação do SNP Bsm GA (genótipo GG) com níveis mais baixos de SHBG, sugerindo que a presença desse genótipo pode estar contribuindo para o aumento dos níveis de androgênios livres e conseqüentemente com a hiperandrogenemia, muitas vezes presente nesse grupo de mulheres. Nesse mesmo trabalho foi verificada a associação do SNP TaqI TC (genótipo CC) com níveis mais elevados de Hormônio Luteinizante (LH) e do SNP FokI CT (genótipo CC) com maior IMC (Ranjad et al. 2011).

## 2. JUSTIFICATIVA

Diante da escassez de dados que possam auxiliar na melhor compreensão do papel da vitamina D e do seu receptor sobre o desenvolvimento de resistência insulínica e hipernadrogenismo e, dos resultados conflitantes encontrados na literatura acerca do SNP-71 do gene da 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 5 e sua relação com o excesso de androgênios, fica evidente a necessidade de mais estudos neste tema, em especial em populações pediátricas e de adolescentes.

### 3. OBJETIVOS

Determinar, em uma amostra de meninas com Pubarca Precoce e meninas controles do sul do Brasil:

- 1- A frequência do SNP-71AG do gene que codifica a enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 5 e verificar se existe associação entre este polimorfismo e variáveis antropométricas, metabólicas e hormonais;
- 2- Os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D;
- 3- A frequência dos polimorfismos FokI, BsmI, ApaI e TaqI do gene do receptor de vitamina D e verificar se existe associação entre estes polimorfismos e variáveis antropométricas, metabólicas e hormonais.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Delineamento

Estudo caso-controle, analisando a frequência dos polimorfismos FokI, BsmI, ApaI e TaqI do gene do VDR e do SNP-71AG do gene que codifica a enzima HSD17B5 em pacientes com PP, comparadas a um grupo controle de meninas saudáveis, e associações destas variantes genéticas com variáveis clínicas, metabólicas e hormonais.

### 4.2. Pacientes

#### 1) Grupo Pubarca Precoce:

Constituído por meninas que estavam em acompanhamento e as que consultaram consecutivamente na Unidade de Endocrinologia Ginecológica do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com diagnóstico de pubarca precoce isolada. As participantes desse grupo foram arroladas por projeto em paralelo do grupo de Pesquisa em Endocrinologia Ginecológica, aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós Graduação e Comissão de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (projeto nº 09-352).

**Critérios de inclusão:** surgimento de pêlos pubianos antes dos oito anos.

**Critérios de exclusão:** desenvolvimento das mamas (Estágio de Tanner >1) ou menarca antes dos oito anos de idade; uso de medicações que possam levar ao surgimento de pubarca e/ou que possam interferir com as variáveis de interesse do estudo, evidência de desenvolvimento puberal precoce verdadeiro (teste de estímulo com LHRH com padrão

puberal); diagnósticos de hiperplasia adrenal congênita (através do teste do ACTH curto) e de tumores produtores de androgênio (ovário, adrenal).

2) Grupo controle:

Constituído por meninas que foram convidadas a participar do projeto por não possuírem doença clínica aparente. As participantes deste grupo foram arroladas pelo projeto n° 09-352 e por projeto de colaboração científica com a Unidade de Endocrinologia Pediátrica da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Trata-se de um estudo de base populacional que realizou recrutamento de crianças e adolescentes em idade escolar da cidade de Curitiba/Paraná. As meninas procedentes desse recrutamento realizaram as avaliações necessárias para que os critérios de inclusão e exclusão fossem atendidos.

**Critérios de inclusão:** meninas que não apresentavam desenvolvimento de caracteres sexuais secundários antes dos oito anos de idade e que não possuíam comorbidades.

**Critérios de exclusão:** história de surgimento de caracteres sexuais antes dos oito anos de idade, uso de medicamentos que pudessem levar ao surgimento de pubarca e/ou que pudessem interferir com as variáveis de interesse do estudo, falsos negativos para hiperplasia adrenal congênita através do teste de 17hidroxiprogesterona (17OHP) ( $\leq 2.00\text{ng/mL}$ ), disfunções de tireóide, doença clínica relatada ou aparente.

#### 4.3. Avaliação Clínica e Antropométrica

A avaliação clínica e antropométrica das meninas com PP e controles arroladas na cidade de Porto Alegre/RS foi realizada pela equipe médica da Unidade de Endocrinologia Ginecológica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, conforme protocolo padrão (Anexo 1).

As meninas arroladas na cidade de Curitiba/PR foram avaliadas pela equipe multidisciplinar constituinte daquele projeto. Tal equipe era composta por profissionais e alunos dos Departamentos de Educação Física, Fisioterapia, Nutrição, Medicina e Enfermagem da Universidade Federal do Paraná. Todas as avaliações foram realizadas nas escolas, em local reservado e pré-determinado pela direção escolar, e em datas pré-definidas.

As participantes realizaram anamnese e exames físicos padronizados que incluíram medidas corporais, aferição de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD), avaliação

do desenvolvimento de caracteres sexuais secundários como pêlos pubianos e mamas (escore de Marshall e Tanner) (Marshall and Tanner 1969) e critérios para hirsutismo, utilizando-se o escore de *Ferriman–Gallway* (Ferriman and Gallwey 1961), presença ou histórico familiar de comorbidades como Diabetes, dislipidemia e hipertensão, dados de desenvolvimento puberal da paciente e de sua progenitora (idade da pubarca, idade da telarca e da menarca), utilização de medicamentos.

As meninas arroladas no Paraná realizaram a avaliação do desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários por auto-avaliação através da apresentação de ilustrações. Essas meninas não realizaram a avaliação para critérios de hirsutismo. O teste realizado em forma de auto-avaliação da pilosidade pubiana é considerado um procedimento simples que pode ser realizado pela própria criança ou adolescente (Bojikian et al. 2002, Matsudo and Matsudo 1994).

As medidas antropométricas foram realizadas conforme descrito abaixo:

**Peso corporal:** medido em quilogramas (Kg), utilizando-se balança digital da marca Fizola com resolução de 100 gramas. As pacientes foram avaliadas descalças e com roupas leves.

**Altura:** Medida em metros (m) com utilização de estadiômetro fixado à parede. As pacientes estavam descalça, na posição ereta e com os calcanhares juntos.

**Índice de Massa Corporal (IMC):** calculado dividindo-se o peso (Kg) pela altura (m) ao quadrado. Este índice foi validado para indivíduos de 2 a 19 anos, apresentando uma correlação com a gordura corporal estimada pelo *dual energy X-ray absorptiometry* (DEXA) de  $r=0,87$  para os meninos e  $r=0,83$  para as meninas (Mei et al. 2002).

**Circunferência da Cintura (CC):** medida em centímetros (cm) com fita métrica flexível e inextensível com escala em 0,1cm. As pacientes foram avaliadas na posição ortostática, com o abdômen relaxado e preferencialmente com o mínimo ou sem a parte superior da vestimenta. A medida foi realizada na parte mais estreita do dorso, em casos de impossibilidade de determinação dessa região, a medida foi realizada no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca.

**Circunferência do Quadril (CQ):** medida em centímetros (cm) com fita métrica flexível e inextensível com escala em 0,1cm, no nível da protusão mais proeminente das nádegas.

**Relação Cintura Quadril (RCQ):** calculada através da divisão da CC pela CQ. Avalia o tipo de distribuição de gordura corporal.

**Pressão Arterial:** foram aferidas as pressões arteriais sistólica (PAS) e diastólica (PAD), em duplicata, com utilização de manguito apropriado para o tamanho do braço do avaliado e com esfigmomanômetro colocado no braço a altura do coração. A mensuração foi feita após repouso de 10 minutos.

Os dados de peso, altura e IMC foram transformados para seus respectivos valores de percentil e score-Z de acordo com as curvas de crescimento para idade e sexo descritas no *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC 2000) (Kuczmarski et al. 2000). Para determinar se o indivíduo apresentava sobrepeso ou obesidade foram adotados os pontos de corte sugeridos por Cole e colaboradores, em 2000 (Cole et al. 2000). São classificados como eutróficos aqueles indivíduos com  $IMC < \text{percentil } 85$ , sobrepeso  $\text{percentil } 85 \leq IMC \leq \text{percentil } 95$ , obesos  $IMC > \text{percentil } 95$ .

#### 4.4. Avaliação Hormonal e Metabólica

As meninas arroladas na cidade de Porto Alegre/RS procederam as coletas de sangue no Centro de Pesquisa Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A punção venosa foi realizada por profissional integrante do grupo de pesquisa da Unidade de Endocrinologia Ginecológica do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em datas pré-agendadas.

A coleta de sangue das pacientes arroladas na cidade de Curitiba/PR foi realizada na própria escola em um local reservado cedido pela direção e realizada por enfermeiras qualificadas da Unidade de Endocrinologia Pediátrica, utilizando materiais descartáveis (seringa e agulhas, BD<sup>®</sup>, Brasil). Todo o material utilizado nas coletas e durante o processo de coleta foi recolhido em recipientes apropriados para o descarte de lixo hospitalar e levado ao Hospital de Clínicas do Paraná para descarte adequado.

Todas as pacientes realizaram coleta de sangue para as dosagens bioquímicas (Colesterol Total, Colesterol HDL e Triglicerídeos) e hormonais (LH, FSH, estradiol, 17OHP, S-DHEA, androstenediona, SHBG, IGF-1, TSH, T4 total, 25(OH)D e insulina). As meninas arroladas pelo projeto em paralelo de POA (n° 09-352) também realizaram coletas para:

hemograma, Aspartato Aminotransferase (TGO), Alanina Aminotransferase (TGP), Creatinina, Hormônio do Crescimento (GH), Prolactina, Fibrinogênio. Dentre essas meninas, aquelas diagnosticadas para PP também coletaram soro para dosagem de Testosterona Total.

As meninas diagnosticadas para PP foram submetidas ao teste do ACTH (0,25mg de ACTH intramuscular) para descartar HAC-NC e teste de estímulo com LHRH para descartar puberdade precoce central (cortrosina 100 mg, EV, coletas de FSH e LH nos tempos 0, 30 e 60). Os valores de LDL foram calculados a partir da fórmula (colesterol total – (Triglicerídeos /5 + HDL).

Todas as coletas foram realizadas entre 8h e 10h da manhã, após jejum noturno de 12h. Os métodos para cada metabólito estão listados na tabela 1.

Tabela 1: Métodos e valores de referência dos testes bioquímicos e hormonais.

Exame	Método
*Colesterol HDL (mg/dL)	Enzimático colorimétrico homogêneo
*Colesterol Total (mg/dL)	Enzimático colorimétrico
*Triglicerídeos (mg/dL)	Enzimático colorimétrico
*Tiroxina – T4 (µg/dL)	Quimioluminescência
*TSH (µUI/mL)	Quimioluminescência
*Estradiol (pg/mL)	Eletroquimioluminescência
*FSH (mUI/mL)	Quimioluminescência
*LH (mUI/mL)	Eletroquimioluminescência
*A=0 (ng/mL)	Quimioluminescência
*IGF-1 (ng/mL)	Quimioluminescência
*SHBG (nmol/L)	Quimioluminescência
*SDHEA (µg/dL)	Eletroquimioluminescência
*17OHP (ng/mL)	Radioimunoensaio
*Prolactina (ng/mL)	Quimioluminescência
Insulina (µUI/mL)	Radioimunoensaio
25(OH)D (ng/mL)	Radioimunoensaio
*Fibrinogênio (mg/dL)	Coagulométrico
*TGO (u/L)	UV cinético
*TGP (u/L)	UV cinético
*Creatinina (mg/dL)	Jaffé sem desproteinização
*Hemograma (mg/dL)	Absorbância de luz / Impedância / Citometria de fluxo
*Testosterona Total (ng/mL)	Quimioluminescência

\*Valores fornecidos pelo Departamento de Bioquímica e Patologia do HCPA.

TSH: Hormônio estimulador da tireóide; FSH: Hormônio Folículo Estimulante; LH: Hormônio Luteinizante; A=0: Androstenediona; IGF-1: Fator de Crescimento Semelhante a Insulina tipo 1; SHBG: Globulina Carreadora dos Hormônios Sexuais; SDHEA: Sulfato de Dehidroepiandrosterona; 17OHP: 17hidroxi-progesterona; 25(OH)D: 25hidroxivitaminaD; TGO: Aspartato Aminotransferase; TGP: Alanina Aminotransferase.

## 4.5. Análise Genotípica

### 4.5.1. Extração do DNA genômico

As amostras de DNA foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico venoso. Para a extração foi escolhido o método de *salting-out* (Miller, Dykes and Polesky 1988). Foram colhidos 4 mL de sangue venoso em ácido etileno diaminotetracético (EDTA, 25 mM). O botão leucocitário foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos com solução de lise de hemácias ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  114 mM,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  1 mM) em incubação a 4°C por 30 minutos. O material foi centrifugado durante 15 minutos a 5000 rpm, sendo desprezado o sobrenadante. O procedimento da lise de glóbulos vermelhos foi repetido por mais duas vezes. O sobrenadante foi descartado e o botão de células brancas foi suspenso em 2,4 mL de solução de lise de leucócitos (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) com 48  $\mu\text{L}$  de dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 40  $\mu\text{L}$  de proteinase K (10 mg/mL) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), posteriormente o material foi submetido a incubação a 37°C por 18 horas. Após este período, 0,96 mL de solução saturada de cloreto de sódio (6 M) foi adicionada agitando-se o conjunto vigorosamente. O material sofreu centrifugação por 15 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e o DNA precipitado com dois volumes de etanol absoluto gelado, homogeneizou-se cuidadosamente por inversão. O DNA precipitado foi retirado do tubo, e em seguida lavado em etanol 70% durante 5 minutos repetindo-se a operação por mais duas vezes. Por fim, o DNA foi lavado em etanol absoluto, sendo seco a temperatura ambiente. Após tal procedimento, o DNA foi ressuspenso em tampão TE (10:0,1) (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0).

### 4.5.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional

O DNA genômico foi utilizado como substrato para a amplificação por PCR de um fragmento contendo dois polimorfismos do gene do VDR: Apal TG (rs7975232) e TaqI TC (rs731236), localizados no intron 8 e éxon 9, respectivamente. Os *primers* utilizados para amplificação do fragmento de interesse foram desenhados no programa Primer Express 3.0 gerando um produto de 740 pares de base (pb).

A reação de PCR foi constituída por 200ng de DNA genômico, 1 $\mu$ L de dNTPs (10mM/ $\mu$ L), 0,5 $\mu$ L de primer *Forward* (GTTTCAGCAGCAAATGGGACACA) e de primer *Reverse* (AGCTTCTGGATCATCTTGGCATAG) (ambos em 1nmol/ $\mu$ L), 0,5 $\mu$ L enzima Taq DNA Polimerase (5 unidades/ $\mu$ L), 5,0 $\mu$ L de PCR *Buffer* 10X, 1,5 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50mM/ $\mu$ L), para um volume final de 50,0 $\mu$ L.

As condições da reação de amplificação foram padronizadas conforme descrito: 1) Desnaturação inicial por 2 minutos a 95°C, 2) Desnaturação por 30 segundos a 95°C, 3) Anelamento a 59,2°C por 30 segundos, 4) Extensão a 72°C por 80 segundos, 5) Extensão final a 72°C por 5 minutos. Os passos 2, 3 e 4 se repetiram por 35 vezes. As reações foram feitas em termociclador TECHNE TC-512. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com Gel Red™ (Nucleic Acid Gel Stain – Biotium, Hayward CS) e visualizados em luz ultravioleta (Figura 4).

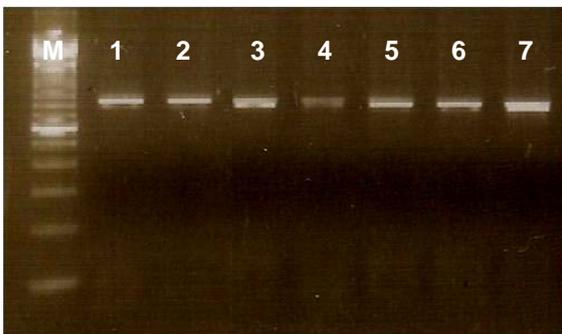


Figura 4: PCR convencional com fragmentos de 714pb, em gel de agarose 1,5% corados com Gel Red. M: marcador de peso molecular (Ladder 100pb).

#### 4.5.3. Reação de Digestão Enzimática

Após amplificação do fragmento do DNA genômico contendo os polimorfismos Apal TG e TaqI TC, realizou-se a análise da presença desses SNPs através da técnica de restrição enzimática. Utilizou-se as endonucleases Apal (New England Biolabs, USA), cujo sítio de restrição é formado na presença do alelo G do SNP Apal TG (5' GGGCC▼C 3'), e a TaqI (New England Biolabs, USA), que reconhece e cliva a seqüência formada na presença do alelo C do SNP TaqI TC (5' T▼CGA 3').

A presença do polimorfismo da Apal TG foi avaliada de acordo com o seguinte protocolo: 5 $\mu$ L do produto da PCR foi submetido a digestão enzimática com 0,6 $\mu$ L da enzima

de restrição Apal (50 unidades/ $\mu$ L), 2X NEBuffer 4 e 0,012 $\mu$ L de *Bovine Serum Albumin* (BSA) (10mg/mL), para um volume final de 20 $\mu$ L e incubação Overnight à 37°C. A presença do polimorfismo gera a clivagem do fragmento de 740pb em dois fragmentos menores de 559pb e 181pb, caracterizando um indivíduo homozigoto GG. Quando não ocorre a clivagem do fragmento pela enzima de restrição, trata-se de um indivíduo homozigoto TT, e o heterozigoto TG é caracterizado pela presença dos três tamanhos de fragmento (figura 5).

O SNP TaqI TC foi verificado através da seguinte reação de restrição enzimática: 5 $\mu$ L do produto da PCR foi submetido a digestão enzimática com 1,5 $\mu$ L da enzima de restrição TaqI (20 unidades/ $\mu$ L), 2X de NEBuffer 4 e 0,015 $\mu$ L de BSA (10mg/mL), para um volume final de 20 $\mu$ L e incubação Overnight à 65°C. A presença do polimorfismo gera a clivagem do fragmento de 740pb em dois fragmentos menores de 635pb e 105pb, caracterizando um indivíduo homozigoto CC. Quando não ocorre a clivagem do fragmento pela enzima de restrição, trata-se de um indivíduo homozigoto TT, e o heterozigoto TC é caracterizado pela presença dos três tamanhos de fragmento (figura 6).

Os produtos da digestão enzimática foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2,0%, corados com Gel Red™ (Nucleic Acid Gel Stain – Biotium, Hayward CS) e visualizados em luz ultravioleta.

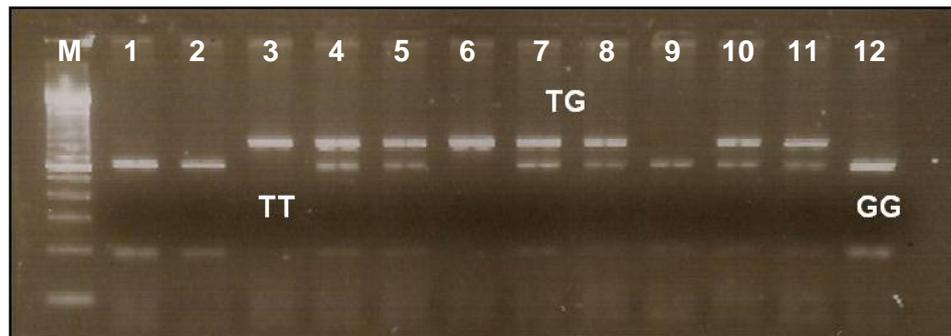


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 2,0% da reação de digestão com a enzima de restrição Apal. M= marcador de peso molecular (Ladder 100pb).

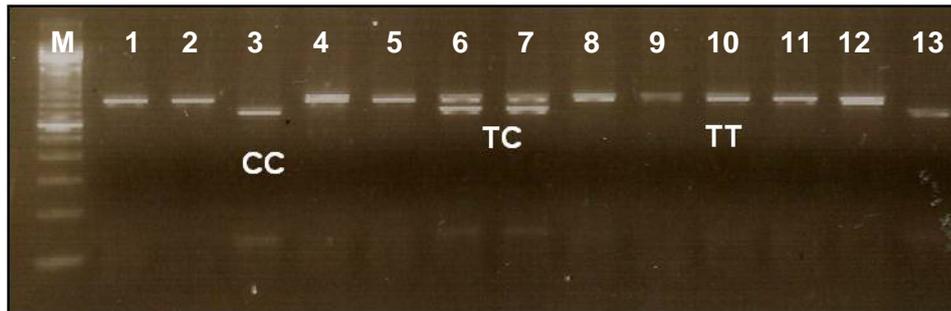


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 2,0% da reação de digestão com a enzima de restrição TaqI. M= marcador de peso molecular (Ladder 100pb).

#### 4.5.4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR)

A genotipagem dos polimorfismos FokI CT, BsmI GA, do gene do VDR, e -71AG do gene da 17 $\beta$ HSD5 foi realizada por PCR em Tempo Real (7500 Fast Applied Biosystems, California, USA) utilizando ensaio de discriminação alélica (Taqman MGB Probes®).

Os *primers* e sondas utilizados foram customizados no programa File Builder 3.0, com base nas informações dos SNPs disponíveis no banco de dados do Website de Publicações Médicas (PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). O desenho e confecção dos primers e sondas foi realizado pela Applied Biosystems e estão listados na tabela 2.

Para a realização do experimento o DNA genômico das pacientes foi diluído em 2ng/ $\mu$ L. As condições de reação para cada polimorfismo estão representadas na tabela 3. Os gráficos representando o padrão de genotipagem obtido para reação de cada SNP estão demonstrados nas figuras 7, 8 e 9.

Tabela 2: *Primers* e sondas utilizados para a genotipagem dos polimorfismos do VDR e da 17 $\beta$ HSD5.

SNP	<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>	Sonda VIC	Sonda FAM
FokI CT	TGGCCTGCTTGCTGTTCTTA	GGGTCAGGCAGGGAAGTG	ATTGCCTCCATCCCTG	TTGCCTCCGTCCCTG
BsmI GA	CCCTTAGCTCTGCCTTGCA	AGCCCAGTTCACGCAAGAG	CCTGCACATTCCCA	CTGCGCATTCCCA
-71 AG	ACTGATGGTTAACCAATGGC ATGTA	GAATGCAATTTTCTCCACAGA CCAT	AAGACTGCCTATGTACC TC	CTGCCTGTGTACCTC

Tabela 3: Condição das reações de PCR em tempo real, ensaio de discriminação alélica para os polimorfismos do VDR e da 17 $\beta$ HSD5.

Polimorfismo	Passo 1		Passo 2	
	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	N° de ciclos
FokI CT	95°C/ 10min	95°C/15seg	60°C/1min	40
BsmI GA	95°C/ 10min	95°C/15seg	60°C/1min	50
-71 AG	95°C/ 10min	95°C/15seg	63°C/1min	40

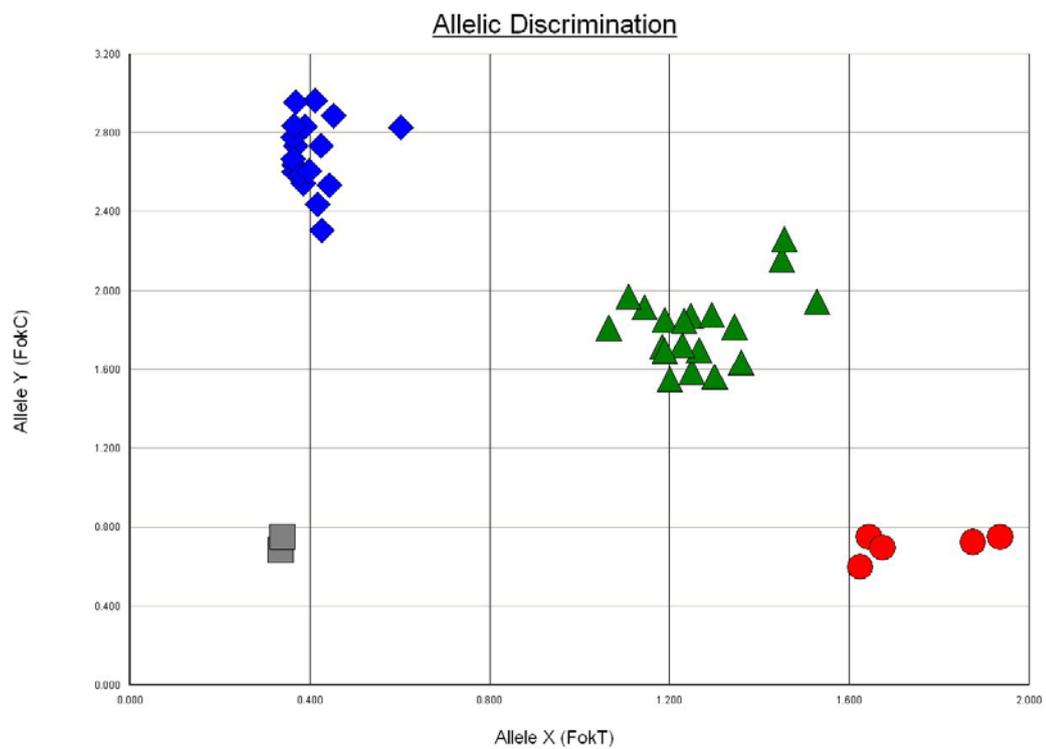


Figura 7: Genotipagem do polimorfismo FokI CT do gene do VDR por PCR em tempo real, ensaio de discriminação alélica.

Legenda: ● = TT ▲ = CT ◆ = CC □ = controle negativo.

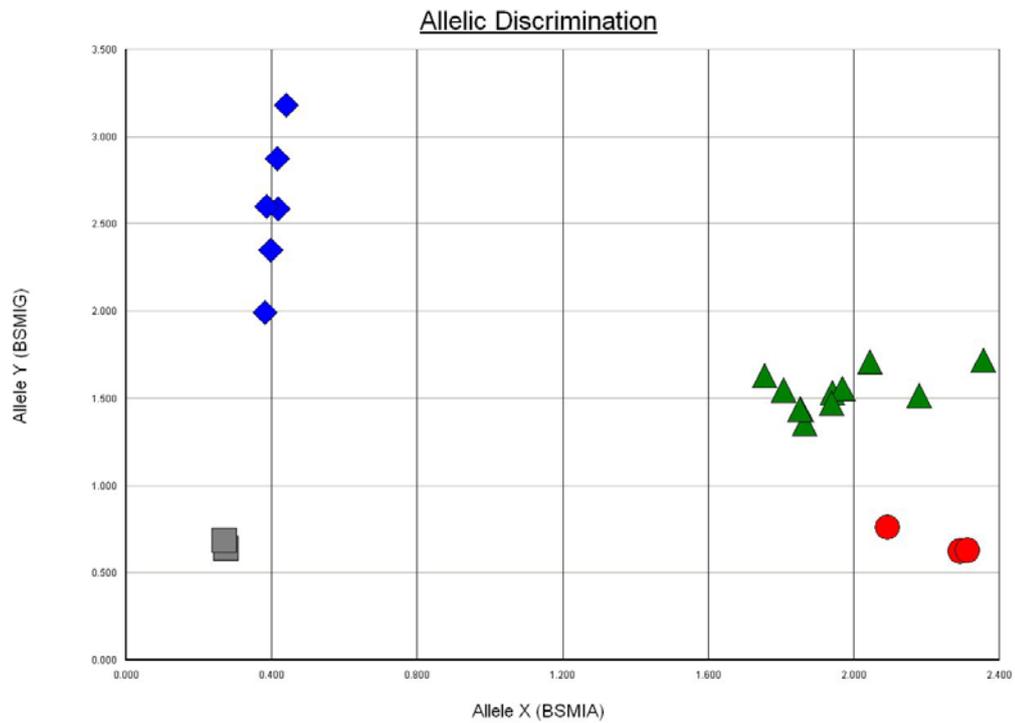


Figura 8: Genotipagem do polimorfismo BsmI GA do gene do VDR por PCR em tempo real, ensaio de discriminação alélica.

Legenda: ● = AA ▲ = AG ◆ = GG □ = controle negativo.

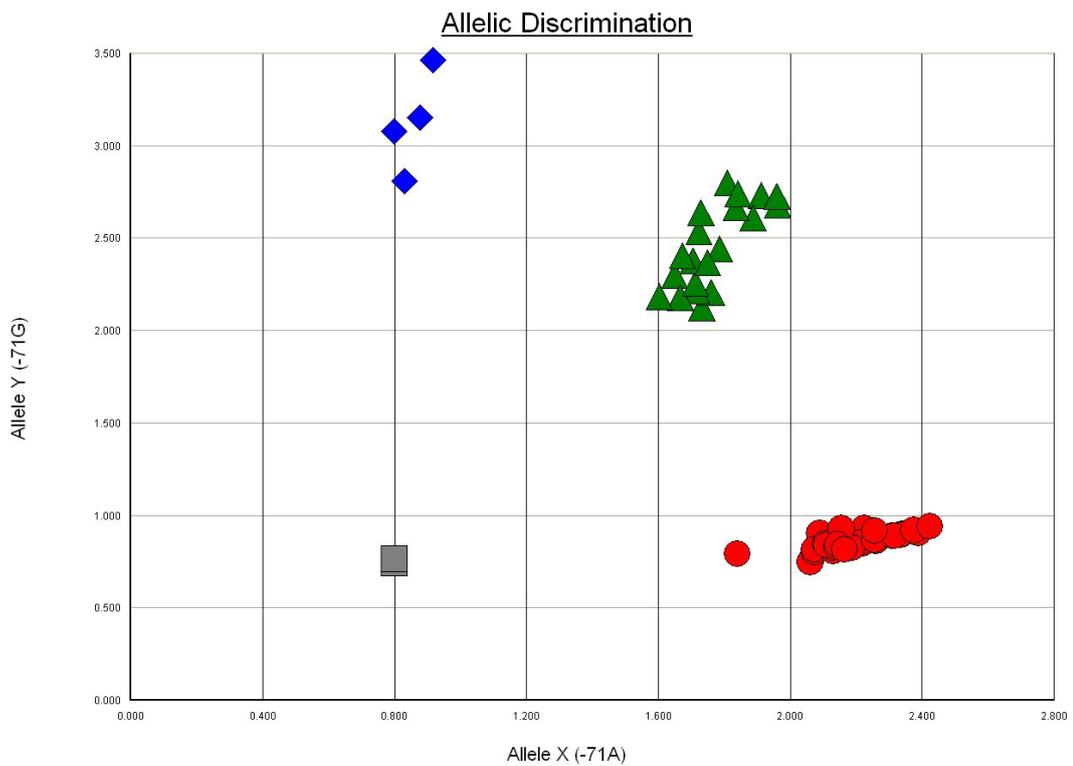


Figura 9: Genotipagem do polimorfismo -71AG do gene da  $17\beta$ HSD5 por PCR em tempo real, ensaio de discriminação alélica.

Legenda: ● = AA ▲ = AG ◆ = GG □ = controle negativo.

#### 4.6. Análise Estatística

Os dados são apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão, medianas e intervalo interquartil (25% - 75%), conforme a natureza gaussiana ou não-gaussiana da variável, ou frequência (percentual). Comparações entre dois grupos foram analisadas pelo teste “t” de Student ou Teste Mann-Whitney U. As variáveis assimétricas foram transformadas para logaritmo e, então, aplicado o teste paramétrico Anova de duas vias. Correlações bivariadas entre variáveis numéricas contínuas foram examinadas utilizando-se coeficientes de correlação de Pearson ou Spearman, conforme natureza gaussiana ou não-gaussiana da variável, respectivamente. Frequências alélicas e genóticas entre grupos foram comparadas com o teste  $\chi^2$ , após ter sido verificado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As análises estatísticas foram realizadas usando-se *Statistical Package for Social Sciences versão 13.0* (SPSS, Chicago, IL, USA) e *Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health versão 2.3.1*, sendo considerado o nível de significância de 5%.

#### 4.7. Considerações Éticas

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-graduação e Comissão de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, projeto número 09-396. Todos os responsáveis pelas participantes assinaram o termo de consentimento pós-informação de acordo com as normas de Pesquisa em Saúde.

Os responsáveis pelas participantes arroladas na Unidade de Endocrinologia Ginecológica do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre assinaram o termo de consentimento livre e informado do projeto aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-graduação e Comissão de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (projeto nº 09-352) (Anexo 2). Os responsáveis pelas pacientes e controles que foram arroladas em escolas da cidade de Curitiba/PR assinaram o termo de consentimento livre e informado aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Anexo 3).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Características clínicas e antropométricas das pacientes estudadas

O presente trabalho avaliou a distribuição genotípica do polimorfismo -71AG do gene da 17 $\beta$ HSD5 e quatro polimorfismos do gene do VDR (FokI, Apal, TaqI e BsmI) em uma amostra de crianças e adolescentes da região sul do Brasil, sendo 36 meninas diagnosticadas para PP (grupo de casos) e 197 meninas saudáveis (grupo de controles). A idade média da amostra como um todo (n= 233) foi de 12,67  $\pm$  2,50 anos, sendo as meninas com PP mais jovens do que as meninas do grupo controle (11,27 $\pm$ 3,79 *versus* 12,92 $\pm$ 2,09, p=0,015). A tabela 4 demonstra o perfil clínico e antropométrico dessas pacientes.

Como demonstrado na tabela 4, as meninas do grupo PP possuem valores de percentual de IMC mais elevados do que o grupo controle. Além disso, a frequência de sobrepeso/obesidade (IMC  $\geq$  percentil 85) apresentou-se mais elevada no grupo caso (42,9%) do que no grupo controle (23,7%) ( $\chi^2= 5,56$ ; p=0,018). Na amostra total, 73,4% das meninas são eutróficas e 26,6% apresentam sobrepeso/obesidade. As medidas de obesidade central, acessada pelas medidas de CC e de RCQ, também se encontram mais elevadas nas meninas com PP (CC: p=0,017; RCQ: p=0,002).

No que se refere aos eventos da puberdade, 38,8% das meninas ainda não apresentam ciclos menstruais. Analisando os grupos separadamente, 57,1% e 35,5% das meninas com PP e controles, respectivamente, não apresentam ciclos. A maturação sexual da amostra total apresentou maior frequência do estágio III de desenvolvimento das glândulas mamárias (34,7%) e do estágio IV de desenvolvimento de pêlos pubianos (34,7%); apresentam-se em estágio pré-púbere (Tanner I) para mamas 13,3% e para pêlos 4,6% das meninas. Ao se analisar separadamente os grupos, a maior parte das meninas com PP se enquadram no estágio I para desenvolvimento de mamas (37,5%) e nos estágios III e V para pêlos pubianos (34,4% em cada estágio). Já as meninas do grupo controle, encontram-se em maior frequência no estágio III para mamas (37,8%) e estágio IV para desenvolvimento de pêlos pubianos (37,4%).

Tabela 4: Características clínicas e antropométricas nas meninas com Pubarca Precoce e Controles

Variável	Todos (233)	Pubarca Precoce (36)	Controles (197)	p
*Peso <sub>percentil</sub>	64.88 (34.43 – 85.52)	81.09 (60.14 – 93.86)	59.21 (33.00-83.34)	0.001
*Peso <sub>scoreZ</sub>	0.38 (-0.40 – 1.06)	0.88 (0.26 – 1.54)	0.23 (-0.44 – 0.97)	0.001
*Altura <sub>percentil</sub>	56.47 (32.09 – 79.38)	58.88 (34.05 – 92.56)	56.45 (31.26 -77.60)	0.157
*Altura <sub>scoreZ</sub>	0.16 (-0.47 – 0.82)	0.22 (-0.40 – 1.44)	0.16 (-0.49 – 0.76)	0.157
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	20.33 ± 3.96	20.98±3.85	20.21±3.98	0.278
*IMC <sub>percentil</sub>	65.03 (34.49 – 85.36)	80.37 (62.69 – 93.44)	60.89 (28.73 -84.19)	0.001
*IMC <sub>scoreZ</sub>	0.39 (-0.40 – 1.05)	0.86 (0.32 – 1.51)	0.28 (-0.56 – 1.01)	0.001
Estágio Mamário	2.98 ± 1.15	2.88±1.72	3.01±1.01 <sup>b</sup>	0.679
Estágio Pubiano	3.38 ± 1.08	3.75±1.08	3.32±1.07	0.036
Id Pubarca (anos)	9.80 ± 2.42	5.02±1.57	10.74± 1.06	<0.001
Id Telarca (anos)	10.17 ± 1.12	9.15±1.11	10.29±1.06	<0.001
Id Menarca (anos)	11.74 ± 1.19	11.22±1.14	11.80±1.19	0.077
PN (Kg)	3.09 ± 0.61	3.09±0.76	3.09±0.57	0.985

IMC: Índice de Massa Corporal; PN: peso ao nascimento.

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil (25% – 75%)

Comparações entre as médias dos grupos analisadas pelo teste *T* de Student

\* Comparações entre as medianas dos grupos analisadas usando-se Teste *Mann-Whitney U*

b: 23 meninas não coletaram o dado

## 5.2. Características metabólicas e hormonais das pacientes estudadas

As características metabólicas e hormonais das meninas incluídas no estudo estão apresentadas na tabela 5. As meninas com PP possuem níveis de SDHEA mais elevados do que as meninas do grupo controle ( $p= 0,001$ ), níveis de LH ( $p=0,048$ ) e estradiol mais baixos ( $p<0,001$ ), independente se as meninas já apresentam ciclos menstruais ( $p=0,036$ ) ou não ( $p=0,012$ ).

A média dos níveis séricos de 25(OH)D na amostra estudada foi de  $20,89\pm 7,26$  ng/mL, somente 9,4% das meninas possuem níveis adequados de Vitamina D circulante ( $\geq 30$  ng/mL) (figura 10). Os níveis desse esteróide encontram-se inferiores nas PP em relação às controles ( $18,08\pm 8,32$  versus  $21,27\pm 7,03$ ;  $p=0,032$ ) (tabela 5), sendo que 59,3% das meninas com PP e 36,7% das controles apresentam deficiência de Vitamina D ( $< 20$  ng/mL) ( $\chi^2=5,04$ ;  $p=0,025$ ; *Odds Ratio*: 2,505; 95% Intervalo de Confiança: 1,102 – 5,692) (tabela 6). Não foram encontradas correlações entre os níveis de 25(OH)D e as demais variáveis endócrino-metabólicas avaliadas.

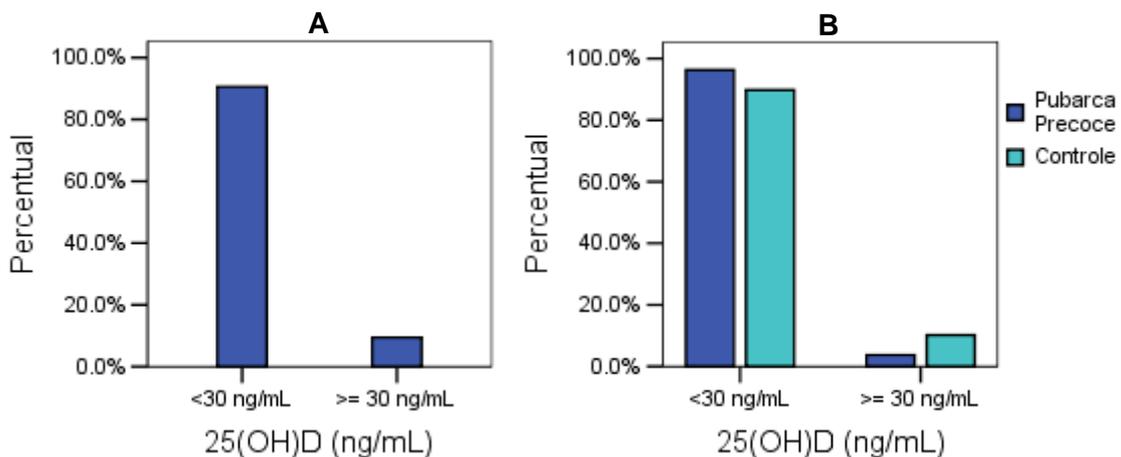


Figura 10: Prevalência de hipovitaminose D na amostra total (A) e nas meninas com PP e controles (B).

Tabela 5: Características metabólicas e hormonais das meninas com Pubarca Precoce e Controles

Variável	Todos (233)	Pubarca Precoce (36)	Controles (197)	p
*LH (mUI/mL)	3.20 (0.90 – 6.00)	1.90 (0.09 – 5.05)	3.30 (1.10 – 6.00)	0.048
*FSH (mUI/mL)	5.00 (3.30 – 6.90)	4.50 (1.75 – 6.20)	5.05 (3.40 – 6.90)	0.102
*Estradiol (pg/mL)	48.40 (29.65 – 76.35)	19.04 (11.61 – 43.90)	50.30 (33.00 – 82.25)	<0.001
*Estradiol s/menarca	30.10 (12.78 – 49.88)	14.65 (7.74 – 39.83)	32.05 (14.55 – 53.73)	0.012
*Estradiol c/menarca	58.40 (43.55 – 93.50)	44.00 (18.50 – 58.80)	60.90 (44.10 – 97.70)	0.036
*SDHEA (µg/dL)	78.80 (50.83 – 128.75)	133.00 (74.00 – 201.90)	76.20 (46.30 – 117.00)	0.001
*17OHP (ng/mL)	0.63 (0.39 – 0.94)	0.69 (0.52 – 1.76)	0.62 (0.38 – 0.92)	0.082
25(OH)D (ng/mL)	20.89±7.26	18.08±8.32	21.27±7.03	0.032
*Insulina (µUI/mL)	14.94 (10.71 – 19.02)	15.07 (11.86 – 21.20)	14.87 (10.68 – 18.92)	0.585
IGF-1 (ng/mL)	461.06±176.77	512.15±277.60	454.61±159.58	0.329
* A=0 (ng/mL)	1.57 (0.97 – 2.29)	1.35 (0.82 – 2.48)	1.60 (1.00 – 2.29)	0.365

LH: Hormônio luteinizante; FSH: Hormônio folículo estimulante; SDHEA: Sulfato de Dehidroepiandrosterona; 17OHP: 17-hidroxiprogesterona; 25(OH)D: 25-hidroxivitamina D; IGF-1: Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1; A=0: Androstenediona.

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil (25% - 75%)

Comparações entre as médias dos grupos analisadas pelo teste *T* de Student

\* Comparações entre as medianas dos grupos analisadas usando-se Teste *Mann-Whitney U*

Tabela 6: Frequência de deficiência de 25(OH)D em meninas com PP e Controles

25(OH)D	PP n (%)	Controles n (%)	p
< 20 ng/mL	16 (59.3)	72 (36.7)	0.025
≥20 ng/mL	11 (40.7)	124 (63.3)	

Teste estatístico do qui-quadrado

### 5.3. Resultados do SNP -71AG do gene da 17 $\beta$ HSD5

A distribuição do polimorfismo -71AG do gene da 17 $\beta$ HSD5 apresenta-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) na amostra total, bem como no grupo PP e no grupo controle. As frequências genóticas e alélicas estão descritas na tabela 7. Não foi encontrada diferença estatística na frequência dos genótipos ( $p=0.165$ ) e dos alelos ( $0.054$ ) entre os grupos de estudo. Da mesma maneira, ao agrupar os genótipos pela presença do alelo recessivo (AA *versus* AG+GG) não se encontrou diferença na distribuição dos genótipos entre as meninas com PP e o grupo controle ( $p=0.078$ ).

Tabela 7: Frequência dos genótipos e alelos do SNP -71AG do gene 17 $\beta$ HSD5 de acordo com os grupos Total, Pubarca Precoce e Controle

Genótipo/Alelo	Todos n (%)	Pubarca Precoce n (%)	Controles n (%)	p
AA	122 (52.4)	14 (38.9)	108 (54.8)	0.165
AG	91 (39.1)	17 (47.2)	74 (37.6)	
GG	20 (8.6)	5 (13.9)	15 (7.6)	
A	335 (72.0)	45 (63.0)	290 (74.0)	0.054
G	131 (28.0)	27 (37.0)	104 (26.0)	

Teste estatístico do qui-quadrado

Analisamos as características clínicas, antropométricas, metabólicas e hormonais em relação aos genótipos agrupados pela presença do alelo recessivo (AA *versus* AG+GG). Nas tabelas 8 e 9 está demonstrado que não houve associação dessas variáveis com os grupos de estudo em relação ao genótipo.

Tabela 8: Análise das variáveis antropométricas e clínicas das meninas com Pubarca Precoce e controles estratificadas pelos genótipos do SNP 17bHSD5 -71AG agrupado para presença do alelo recessivo

Característica	Pubarca Precoce		$p^a$	Controle		$p^a$	$P_{Gen}^b$	$P_{Diag}^b$	$P_{INT}^b$
	AA (14)	AG + GG (22)		AA (108)	AG + GG (89)				
Idade (anos)	11.83 ± 4.25	10.92 ± 3.53	0.488	12.94 ± 2.27	12.90 ± 1.87	0.887	0.289	0.001	0.335
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	21.15 ± 3.54	20.88 ± 4.11	0.843	20.20 ± 3.86	20.23 ± 4.14	0.957	0.873	0.280	0.840
*IMC <sub>percentil</sub>	1.84 ± 0.19	1.82 ± 0.26	0.772	1.67 ± 0.36	1.67 ± 0.30	0.732	0.948	0.008	0.737
IMC <sub>scoreZ</sub>	0.87 ± 0.88	0.87 ± 1.02	0.999	0.25 ± 0.99	0.26 ± 0.95	0.953	0.981	0.001	0.983
Estágio Mamário	3.00 ± 1.78	2.79 ± 1.72	0.740	2.92 ± 1.01	3.11 ± 1.00	0.238	0.959	0.588	0.381
Estágio Pubiano	3.85 ± 1.07	3.68 ± 1.11	0.683	3.27 ± 1.13	3.37 ± 1.00	0.539	0.877	0.035	0.537
Id Pubarca (anos)	4.68 ± 1.73	5.24 ± 1.46	0.303	10.86 ± 1.14	10.61 ± 0.94	0.110	0.470	<0.001	0.060
Id Telarca (anos)	9.65 ± 0.94	8.87 ± 1.14	0.117	10.40 ± 1.08	10.16 ± 1.02	0.133	0.041	<0.001	0.270
Id Menarca (anos)	11.46 ± 0.80	11.06 ± 1.35	0.533	11.81 ± 1.19	11.78 ± 1.19	0.917	0.531	0.109	0.575
PN (Kg)	3.34 ± 0.90	2.94 ± 0.64	0.147	3.04 ± 0.58	3.15 ± 0.57	0.191	0.227	0.700	0.030

IMC: Índice de Massa Corporal; PN: peso ao nascimento

a: Teste estatístico: Teste *T* de Student

b: Teste estatístico: ANOVA de duas vias

\* Variáveis transformadas para logaritmo

Tabela 9: Análise das variáveis metabólicas e hormonais das meninas com Pubarca Precoce e controles estratificadas pelos genótipos do SNP 17bHSD5 -71AG agrupado para presença do alelo recessivo

Característica	Pubarca Precoce		p <sup>a</sup>	Controle		p <sup>a</sup>	P <sub>Gen</sub> <sup>b</sup>	P <sub>Diag</sub> <sup>b</sup>	P <sub>INT</sub> <sup>b</sup>
	AA (14)	AG + GG (22)		AA (108)	AG + GG (89)				
*LH (mUI/mL)	0.06±0.78	0.01±0.91	0.863	0.31±0.73	0.35±0.64	0.726	0.952	0.027	0.748
*FSH (mUI/mL)	0.57±0.39	0.53±0.31	0.713	0.68±0.27	0.65±0.22	0.530	0.502	0.022	0.829
*Estradiol (pg/mL)	1.35±0.47	1.37±0.39	0.924	1.72±0.38	1.66±0.35	0.234	0.741	<0.001	0.595
*Estradiol s/menarca	1.27±0.59	1.21±0.30	0.820	1.46±0.41	1.48±0.35	0.855	0.847	0.025	0.722
*Estradiol c/menarca	1.50±0.32	1.70±0.36	0.357	1.86±0.28	1.77±0.31	0.128	0.524	0.026	0.137
*SDHEA (µg/dL)	2.04±0.40	2.09±0.32	0.646	1.87±0.30	1.85±0.29	0.679	0.730	0.001	0.512
*17OHP (ng/mL)	-0.03±0.31	-0.17±0.40	0.273	-0.22±0.26	-0.23±0.26	0.795	0.147	0.023	0.203
25(OH)D (ng/mL)	17.47±8.68	18.64±8.7	0.723	21.21±6.54	21.35±7.63	0.893	0.661	0.031	0.729
*A=0 (ng/mL)	0.10±0.31	0.14±0.31	0.671	0.20±0.37	0.24±0.35	0.561	0.566	0.142	0.905
IGF-1(ng/mL)	517.05±332.76	508.66±244.24	0.944	460.80±165.26	447.28±153.20	0.562	0.778	0.131	0.947
* Insulina (µUI/mL)	1.20±0.23	1.17±0.17	0.646	1.16±0.21	1.16±0.21	0.980	0.677	0.527	0.690
*Testosterona Total (ng/mL)	-0.33±0.30	-0.43±0.37	0.412	-	-	-	-	-	-

LH: Hormônio luteinizante; FSH: Hormônio folículo estimulante; SDHEA: Sulfato de Dehidroepiandrosterona; 17OHP: 17-hidroxiprogesterona; 25(OH)D: 25-hidroxivitamina D; IGF-1: Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1; A=0: Androstenediona.

Dados expressos em média ± desvio padrão

a: Teste estatístico: Teste T de Student

b: Teste estatístico: Anova de duas vias

\* Variáveis transformadas para logaritmo

#### 5.4. Resultados dos SNPs do gene do Receptor da Vitamina D

O presente trabalho avaliou a distribuição genotípica de quatro polimorfismos do gene do VDR (ApaI TG, TaqI TC, BsmI GA e FokI CT) em uma amostra de crianças e adolescentes da região sul do Brasil, sendo 36 meninas diagnosticadas para PP e 197 meninas saudáveis (controles).

##### 5.4.1. Análise do SNP ApaI TG do gene do Receptor da Vitamina D

A distribuição do polimorfismo ApaI TG do gene do VDR apresenta-se em EHW na amostra total ( $\chi^2= 0,82$ ), bem como no grupo PP ( $\chi^2= 0,42$ ) e no grupo controle ( $\chi^2= 1,84$ ). As frequências genotípicas e alélicas estão descritas na tabela 10. Não encontramos diferença nas frequências genotípica e alélica entre os grupos PP e controles. No entanto, observou-se que a presença em homozigose do alelo variante (genótipo polimórfico GG) está associada com PP, apresentando-se com uma frequência maior nas PP (30,6%) do que nas controles (16,2%) ( $\chi^2= 4,14$ ;  $p=0,042$ ; *Odds Ratio*: 2,269; 95% Intervalo de Confiança: 1,015 – 5,076) (figura 11).

Tabela 10: Frequência dos genótipos e alelos do SNP ApaI TG do gene do VDR de acordo com os grupos Total, Pubarca Precoce e Controle

Genótipo/Alelo	Todos	Pubarca Precoce	Controles	p
	n (%)	n (%)	n (%)	
TT	68 (29.2)	9 (25.0)	59 (29.9)	0.126
TG	122 (52.4)	16 (44.4)	106 (53.8)	
GG	43 (18.5)	11 (30.6)	32 (16.2)	
T	258 (55.4)	34 (47.0)	224 (57.0)	0.438
G	208 (44.6)	38 (53.0)	170 (43.0)	

Teste estatístico do qui-quadrado

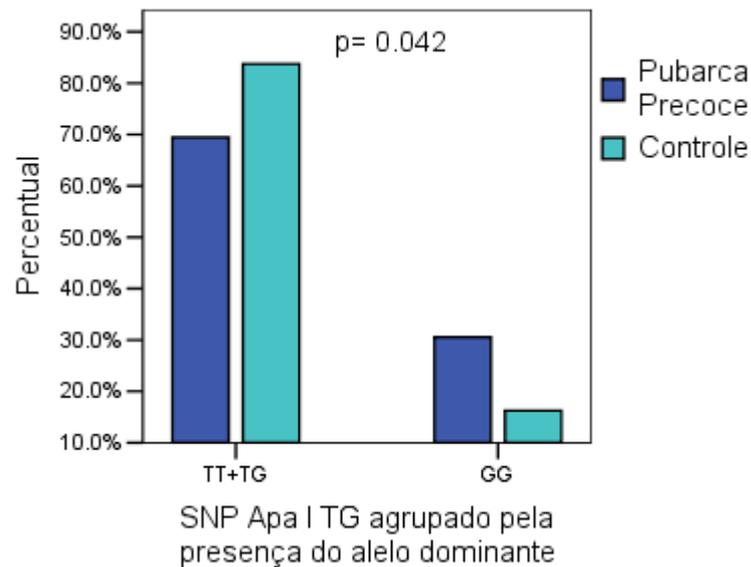


Figura 11: Frequência do SNP Apa I TG do gene do VDR agrupado pela presença do alelo dominante. Teste estatístico do qui-quadrado.

Analizamos as características clínicas, antropométricas, metabólicas e hormonais em relação aos genótipos agrupados pela presença do alelo selvagem (TT+TG *versus* GG), uma vez que o risco relativo para o desenvolvimento de PP está associado a presença do alelo polimórfico em homozigose. Na tabela 11 está demonstrado que não houve associação do perfil clínico e antropométrico dos grupos de estudo com o polimorfismo.

Por outro lado, ao analisarmos o perfil hormonal, verificamos que as meninas com PP e portadoras do genótipo GG possuem níveis séricos de estradiol mais baixo que as PP que não possuem o genótipo polimórfico em homozigose e controles de ambos os grupos genotípicos ( $p=0,022$ ) (tabela 12). Dentre as meninas com PP, é observado que aquelas com o genótipo GG possuem níveis de Testosterona Total inferiores às PP com genótipo TT+TG (0,52 (0,39 – 0,84) *versus* 0,20 (0,11 – 0,47);  $p=0,009$ ), o mesmo é observado para os níveis de estradiol (35,30 (14,80 – 50,48) *versus* 12,22 (6,49 – 23,69);  $p=0,030$ ) (figura 12).

Tabela 11: Análise das variáveis antropométricas e clínicas das meninas com Pubarca Precoce e controles estratificadas pelos genótipos do SNP Apal TG agrupado para presença do alelo dominante

Característica	Pubarca Precoce		p <sup>a</sup>	Controle		p <sup>a</sup>	P <sub>Gen</sub> <sup>b</sup>	P <sub>Diag</sub> <sup>b</sup>	P <sub>INT</sub> <sup>b</sup>
	TT + TG (25)	GG (11)		TT + TG (165)	GG (32)				
Idade (anos)	11.50 ± 3.93	10.76 ± 3.58	0.599	12.95 ± 2.12	12.77 ± 1.97	0.655	0.359	0.001	0.580
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	21.45 ± 3.56	19.95 ± 4.43	0.293	20.31 ± 3.93	19.75 ± 4.23	0.474	0.212	0.413	0.567
*IMC <sub>percentil</sub>	1.87 ± 0.19	1.72 ± 0.29	0.142	1.68 ± 0.33	1.59 ± 0.36	0.174	0.071	0.015	0.632
IMC <sub>scoreZ</sub>	1.01 ± 0.79	0.57 ± 1.23	0.218	0.29 ± 0.96	0.09 ± 1.05	0.281	0.113	0.003	0.566
Estágio Mamário	2.90 ± 1.76	2.82 ± 1.72	0.895	3.03 ± 1.02	2.88 ± 0.95	0.504	0.642	0.701	0.907
Estágio Pubiano	3.71 ± 1.10	3.82 ± 1.08	0.800	3.33 ± 1.09	3.25 ± 0.98	0.706	0.956	0.036	0.687
Id Pubarca (anos)	5.22 ± 1.39	4.57 ± 1.91	0.257	10.72 ± 1.05	10.85 ± 1.10	0.527	0.278	<0.001	0.100
Id Telarca (anos)	9.25 ± 1.24	8.94 ± 0.82	0.554	10.26 ± 1.06	10.44 ± 1.05	0.383	0.807	<0.001	0.353
Id Menarca (anos)	11.23 ± 1.32	11.19 ± 0.55	0.946	11.77 ± 1.20	11.96 ± 1.12	0.552	0.857	0.088	0.761
PN (Kg)	3.16 ± 0.87	2.96 ± 0.44	0.500	3.11 ± 0.56	2.97 ± 0.63	0.205	0.182	0.876	0.869

IMC: Índice de massa corporal; PN: peso ao nascimento

Dados expressos em média ± desvio padrão

\*Variáveis transformadas para logaritmo

a: Teste estatístico: Teste *T* de Student

b: Teste estatístico: Anova de duas vias

Tabela 12: Análise das variáveis metabólicas e hormonais das meninas com Pubarca Precoce e controles estratificadas pelos genótipos do SNP Apal TG agrupado para presença do alelo dominante

Característica	Pubarca Precoce		p <sup>a</sup>	Controle		p <sup>a</sup>	P <sub>Gen</sub> <sup>b</sup>	P <sub>Diag</sub> <sup>b</sup>	P <sub>INT</sub> <sup>b</sup>
	TT+TG (25)	GG (11)		TT+TG (165)	GG (32)				
*LH (mUI/mL)	0.07±0.86	-0.74±0.85	0.648	0.30±0.71	0.44±0.57	0.298	0.991	0.011	0.339
*FSH (mUI/mL)	0.58±0.35	0.48±0.32	0.455	0.67±0.25	0.66±0.23	0.806	0.332	0.015	0.452
*Estradiol (pg/mL)	1.47±0.42	1.12±0.33	0.029	1.69±0.37	1.72±0.35	0.737	0.045	<0.001	0.022
*Estradiol s/menarca	1.33±0.43	1.04±0.32	0.128	1.43±0.37	1.64±0.36	0.049	0.700	0.001	0.015
*Estradiol c/menarca	1.72±0.31	1.33±0.29	0.088	1.83±0.29	1.78±0.34	0.576	0.045	0.010	0.108
*SDHEA (µg/dL)	2.13±0.35	1.94±0.33	0.141	1.87±0.29	1.84±0.31	0.574	0.076	0.004	0.206
*17OHP (ng/mL)	-0.76±0.38	-0.18±0.34	0.454	-0.22±0.25	-0.23±0.29	0.836	0.325	0.089	0.421
*A=0 (ng/mL)	0.16±0.30	0.06±0.34	0.381	0.20±0.37	0.31±0.35	0.147	0.937	0.044	0.150
25(OH)D (ng/mL)	17.61±8.42	19.19±8.55	0.662	21.68±6.92	19.18±7.35	0.065	0.781	0.224	0.221
IGF-1(ng/mL)	556.79±147.37	422.89±329.27	0.275	444.36±161.58	505.21±140.88	0.049	0.378	0.716	0.020
*Insulina (µUI/mL)	1.21±0.20	1.13±0.17	0.381	1.14±0.20	1.21±0.27	0.176	0.938	0.800	0.151
*TT (ng/mL)	-0.29±0.30	-0.62±0.34	0.006	-	-	-	-	-	-

LH: Hormônio luteinizante; FSH: Hormônio folículo estimulante; SDHEA: Sulfato de Dehidroepiandrosterona; 17OHP: 17-hidroxiprogesterona; 25(OH)D: 25-hidroxivitamina D; IGF-1: Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1; A=0: Androstenediona.

Dados expressos em média ± desvio padrão

a: Teste estatístico: Teste *T* de Student

b: Teste estatístico: Anova de duas vias

\* Variáveis transformadas para logaritmo

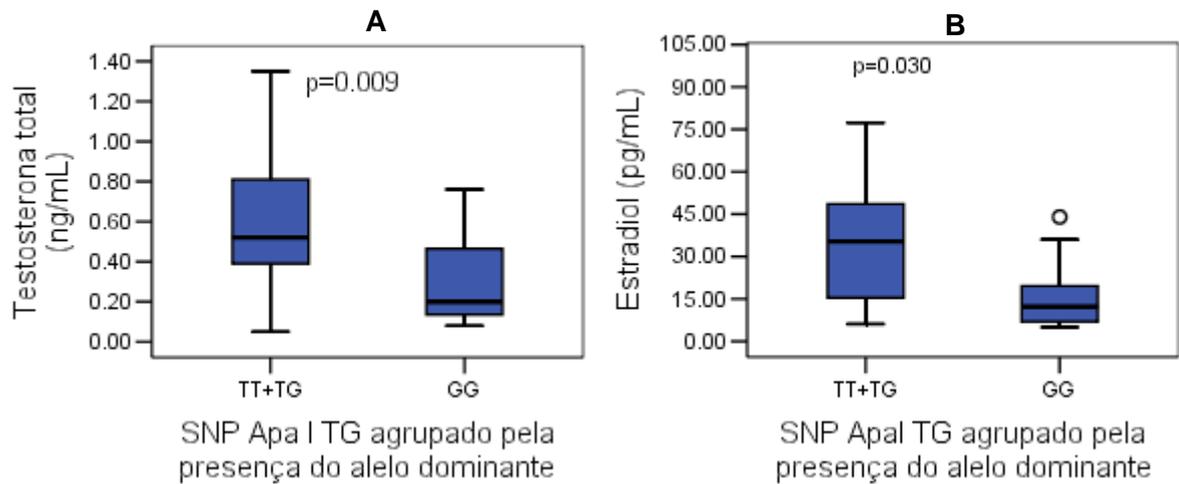


Figura 12: Níveis séricos de Testosterona total (A) e Estradiol (B) nas meninas com PP de acordo com os genótipos do SNP Apa I TG agrupados pela presença do alelo dominante. Teste estatístico *Mann-Whitney*.

#### 5.4.2. Análise dos SNPs TaqI TC e BsmI GA do gene do Receptor da Vitamina D

A distribuição dos polimorfismos TaqI TC e BsmI GA apresentam-se em EHW na amostra total ( $\chi^2=0,01$ ;  $\chi^2=0,67$ , respectivamente), bem como no grupo PP ( $\chi^2=2,44$ ;  $\chi^2=3,15$ , respectivamente), e no grupo controle ( $\chi^2=0,51$ ;  $\chi^2=0,02$ , respectivamente). Para o SNP BsmI GA, uma paciente com PP não foi genotipada devido aos resultados negativos na amplificação da amostra com a metodologia utilizada.

As frequências genóticas e alélicas de ambos os polimorfismos estão descritas na tabela 13. Não foi observada diferença na distribuição dos genótipos (TaqI TC:  $p=0,225$ ; BsmI GA:  $p=0,292$ ) e dos alelos (TaqI TC:  $p=0,826$ ; BsmI GA:  $p=0,720$ ) entre os grupos de estudo.

Tabela 13: Frequência dos genótipos e alelos dos SNPs TaqI TC e BsmI GA do gene do VDR de acordo com os grupos Total, Pubarca Precoce e Controles

Genótipo/Alelo	Todos n (%)	Pubarca Precoce n (%)	Controles n (%)	p
<b>SNP TaqI TC</b>				
TT	113 (48.5)	20 (55.6)	93 (47.2)	0.225
TC	99 (42.5)	11 (30.6)	88 (44.7)	
CC	21 (9.0)	5 (13.9)	16 (8.1)	
T	325 (69.7)	51(71.0)	274 (70.0)	0.826
C	141 (30.3)	21(29.9)	120 (30.0)	
<b>SNP BsmI GA</b>				
GG	115 (49.6)	20 (57.1)	95 (48.2)	0.292
GA	93 (40.1)	10 (28.6)	83 (42.1)	
AA	24 (10.3)	5 (14.3)	19 (9.6)	
G	323 (69.6)	50 (72.0)	273 (69.0)	0.720
A	141(30.4)	20 (28.0)	121 (31.0)	

Teste estatístico do qui-quadrado

Para efetuar as análises, agrupamos os polimorfismos de acordo com a presença do alelo recessivo. Nas tabelas 14 e 15 está demonstrado que não houve associação dos dados clínicos e antropométricos com a presença dos polimorfismos TaqI TC e BsmI GA nos grupos PP e controles.

Tabela 14: Análise das variáveis antropométricas e clínicas das meninas com Pubarca Precoce e controles estratificadas pelos genótipos do SNP TaqI TC agrupado para presença do alelo recessivo

Característica	Pubarca Precoce		$p^a$	Controle		$p^a$	$P_{Gen}^b$	$P_{Diag}^b$	$P_{INT}^b$
	TT (20)	TC + CC (16)		TT (93)	TC + CC (104)				
Idade (anos)	11.55±4.02	10.93±3.59	0.633	12.73±2.17	13.10±2.02	0.200	0.790	<0.001	0.259
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	21.00±4.26	20.96±3.40	0.976	20.04±4.16	20.37±3.81	0.562	0.840	0.285	0.798
*IMC <sub>percentil</sub>	1.79±0.25	1.86±0.23	0.414	1.63±0.38	1.69±0.29	0.200	0.278	0.006	0.965
IMC <sub>scoreZ</sub>	0.77±1.05	0.99±0.85	0.501	0.21±1.04	0.30±0.91	0.508	0.380	0.001	0.719
Estágio Mamário	3.28±1.71	2.36±1.65	0.135	2.97±1.01	3.03±1.01	0.703	0.054	0.403	0.028
Estágio Pubiano	3.89±1.08	3.57±1.09	0.417	3.27±1.15	3.36±1.01	0.579	0.580	0.046	0.330
Id Pubarca (anos)	4.79±1.57	5.31±1.57	0.326	10.70±1.07	10.78±1.04	0.586	0.151	<0.001	0.301
Id Telarca (anos)	9.20±0.95	9.06±1.42	0.786	10.31±1.05	10.27±1.06	0.766	0.711	<0.001	0.853
Id Menarca (anos)	11.20±1.07	11.25±1.35	0.942	11.94±1.18	11.70±1.18	0.263	0.770	0.076	0.665
PN (Kg)	2.95±0.58	3.27±0.93	0.227	3.01±0.59	3.17±0.56	0.062	0.035	0.816	0.476

IMC: Índice de massa corporal; PN: peso ao nascimento

Dados expressos em média ± desvio padrão

\*Variáveis transformadas para logaritmo

a: Teste estatístico: Teste *T* de Student

b: Teste estatístico: Anova de duas vias

Tabela 15: Análise das variáveis antropométricas e clínicas das meninas com Pubarca Precoce e controles estratificadas pelos genótipos do SNP BsmI GA agrupado para presença do alelo recessivo

Característica	Pubarca Precoce		p <sup>a</sup>	Controle		p <sup>a</sup>	P <sub>Gen</sub> <sup>b</sup>	P <sub>Diag</sub> <sup>b</sup>	P <sub>INT</sub> <sup>b</sup>
	GG (20)	GA + AA (15)		GG (95)	GA + AA (102)				
Idade (anos)	11.81±3.90	10.79±3.73	0.442	12.65±2.25	13.18±1.92	0.075	0.588	<0.001	0.085
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	21.04±4.4	20.89±3.55	0.912	20.19±4.18	20.24±3.79	0.929	0.946	0.311	0.891
*IMC <sub>percentil</sub>	1.79±0.24	1.86±0.24	0.347	1.65±0.38	1.68±0.29	0.556	0.374	0.009	0.677
IMC <sub>scoreZ</sub>	0.72±1.05	1.00±0.83	0.406	0.27±1.04	0.25±0.91	0.858	0.486	0.001	0.404
Estágio Mamário	3.28±1.71	2.46±1.66	0.195	2.94±1.04	3.07±0.97	0.396	0.132	0.553	0.036
Estágio Pubiano	3.89±1.08	3.69±1.03	0.614	3.31±1.17	3.32±0.98	0.923	0.667	0.025	0.616
Id Pubarca (anos)	4.74±1.61	5.22±1.40	0.360	10.68±1.12	10.79±1.00	0.494	0.165	<0.001	0.376
Id Telarca (anos)	9.18±0.98	9.10±1.39	0.886	10.29±1.07	10.29±1.05	0.983	0.878	<0.001	0.889
Id Menarca (anos)	11.20±1.07	11.25±1.35	0.942	11.85±1.22	11.77±1.16	0.673	0.947	0.084	0.837
PN (Kg)	2.93±0.56	3.34±0.96	0.130	3.00±0.57	3.17±0.57	0.050	0.012	0.688	0.285

IMC: Índice de massa corporal; PN: peso ao nascimento

Dados expressos em média ± desvio padrão

\*Variáveis transformadas para logaritmo

a: Teste estatístico: Teste T de Student

b: Teste estatístico: Anova de duas vias

Por outro lado, ao analisarmos o perfil hormonal, dentre as meninas pertencentes ao grupo controle, verificou-se uma associação entre a presença dos polimorfismos TaqI TC (genótipo TC+CC) e BsmI GA (genótipo GA+AA) e níveis séricos de 25(OH)D mais elevados ( $19,86 \pm 7,16$  versus  $22,55 \pm 6,69$ ,  $p=0,007$ ;  $19,53 \pm 6,94$  versus  $22,88 \pm 6,76$ ,  $p=0,001$ , respectivamente) (figura 13). No mesmo sentido, a frequência de deficiência de Vitamina D apresenta-se diminuída na presença dos polimorfismos TaqI TC (genótipo TC+CC) ( $\chi^2=4,11$ ,  $p=0,042$ ; *Odds Ratio*: 1,831; 95% Intervalo de Confiança: 1,018 – 3,294) e BsmI GA (genótipo GA+AA) ( $\chi^2=6,31$ ,  $p=0,012$ ; *Odds Ratio*: 2,122; 95% Intervalo de Confiança: 1,175 – 3,834) (tabela 16).

Para as demais variáveis hormonais não foram encontradas diferenças em relação aos genótipos dos SNPs TaqI TC e BsmI GA nos grupos de estudo (tabelas 17 e 18, respectivamente).

Tabela 16: Frequência de deficiência de 25(OH)D, nas meninas do grupo Controle, de acordo com os genótipos dos SNPs TaqI TC e BsmI GA agrupados pela presença do alelo recessivo

25(OH)D	Taq TT n (%)	Taq TC+CC n (%)	p
< 20 ng/mL	41 (44.1)	31 (30.1)	0.042
≥20 ng/mL	52 (55.9)	72 (69.9)	
	BsmI GG n (%)	BsmI GA+AA n (%)	p
< 20 ng/mL	43 (45.7)	29 (28.4)	0.012
≥20 ng/mL	51 (54.30)	73 (71.6)	

Teste estatístico do qui-quadrado

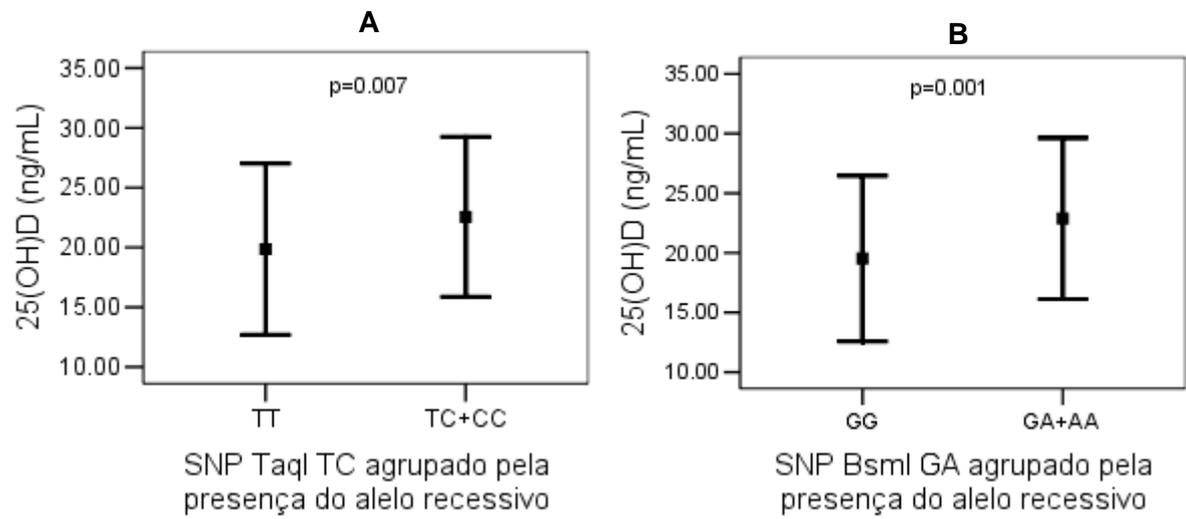


Figura 13: Níveis séricos de 25(OH)D, nas meninas do grupo controle, de acordo com o SNP TaqI TC (A) e BsmI GA (B) agrupados pela presença do alelo recessivo. Teste estatístico *T* de Student.

Tabela 17: Análise das variáveis metabólicas e hormonais das meninas com Pubarca Precoce e controles estratificadas pelos genótipos do SNP TaqI TC agrupado para presença do alelo recessivo

Característica	Pubarca Precoce		p <sup>a</sup>	Controle		p <sup>a</sup>	P <sub>Gen</sub> <sup>b</sup>	P <sub>Diag</sub> <sup>b</sup>	P <sub>INT</sub> <sup>b</sup>
	TT (20)	TC + CC (16)		TT (93)	TC + CC (104)				
*LH (mUI/mL)	0.15±0.76	-0.14±0.94	0.313	0.35±0.69	0.31±0.70	0.735	0.217	0.016	0.328
*FSH (mUI/mL)	0.59±0.30	0.50±0.39	0.431	0.66±0.24	0.67±0.26	0.712	0.417	0.011	0.279
*Estradiol (pg/mL)	1.33±0.36	1.39±0.50	0.698	1.66±0.34	1.73±0.39	0.136	0.339	<0.001	0.896
*Estradiol s/menarca	1.22±0.39	1.24±0.45	0.915	1.48±0.34	1.46±0.42	0.762	0.970	0.017	0.808
*Estradiol c/menarca	1.52±0.26	1.78±0.44	0.246	1.78±0.28	1.85±0.31	0.252	0.103	0.086	0.313
*SDHEA (µg/dL)	2.06±0.38	2.08±0.32	0.919	1.83±0.31	1.90±0.28	0.110	0.474	<0.001	0.622
*17OHP (ng/mL)	-0.18±0.30	-0.01±0.44	0.192	-0.20±0.26	-0.24±0.26	0.239	0.222	0.018	0.043
*A=0 (ng/mL)	0.08±0.31	0.18±0.31	0.391	0.25±0.39	0.18±0.34	0.133	0.924	0.169	0.195
25(OH)D (ng/mL)	17.68±8.01	18.51±8.96	0.800	19.86±7.16	22.55±6.69	0.007	0.229	0.035	0.526
IGF-1(ng/mL)	492.97±280.88	534.82±285.53	0.722	459.60±171.41	449.93±148.35	0.678	0.676	0.125	0.504
*Insulina (µUI/mL)	1.21±0.21	1.14±0.17	0.390	1.15±0.24	1.16±0.18	0.866	0.482	0.599	0.413
*TT (ng/mL)	-0.45±0.42	-0.31±0.20	0.177	-	-	-	-	-	-

LH: Hormônio luteinizante; FSH: Hormônio foliculo estimulante; SDHEA: Sulfato de Dehidroepiandrosterona; 17OHP: 17-hidroxiprogesterona; 25(OH)D: 25-hidroxivitamina D; IGF-1: Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1; A=0: Androstenediona.

Dados expressos em média ± desvio padrão

a: Teste estatístico: Teste *T* de Student

b: Teste estatístico: Anova de duas vias

\* Variáveis transformadas para logaritmo

Tabela 18: Análise das variáveis metabólicas e hormonais das meninas com Pubarca Precoce e controles estratificadas pelos genótipos do SNP BsmI GA agrupado para presença do alelo recessivo

Característica	Pubarca Precoce		p <sup>a</sup>	Controle		p <sup>a</sup>	P <sub>Gen</sub> <sup>b</sup>	P <sub>Diag</sub> <sup>b</sup>	P <sub>INT</sub> <sup>b</sup>
	GG (20)	GA + AA (15)		GG (95)	GA + AA (102)				
*LH (mUI/mL)	0.11±0.76	-0.01±0.92	0.684	0.35±0.68	0.30±0.70	0.601	0.521	0.036	0.801
*FSH (mUI/mL)	0.56±0.30	0.56±0.40	0.982	0.66±0.24	0.67±0.26	0.849	0.924	0.029	0.966
*Estradiol (pg/mL)	1.32±0.35	1.43±0.52	0.472	1.66±0.35	1.73±0.38	0.180	0.211	<0.001	0.768
*Estradiol s/menarca	1.19±0.36	1.28±0.50	0.664	1.50±0.39	1.44±0.37	0.493	0.904	0.023	0.459
*Estradiol c/menarca	1.52±0.26	1.78±0.44	0.246	1.78±0.27	1.85±0.31	0.154	0.087	0.085	0.349
*SDHEA (µg/dL)	2.05±0.38	2.14±0.28	0.467	1.84±0.31	1.89±0.27	0.688	0.229	<0.001	0.741
*17OHP (ng/mL)	-0.18±0.31	-0.02±0.43	0.226	-0.22±0.26	-0.24±0.26	0.534	0.197	0.022	0.085
*A=0 (ng/mL)	0.10±0.31	0.21±0.26	0.263	0.25±0.40	0.19±0.32	0.209	0.717	0.312	0.175
25(OH)D (ng/mL)	17.68±8.01	18.84±9.27	0.733	19.53±6.94	22.88±6.76	0.001	0.128	0.048	0.461
IGF-1(ng/mL)	473.89±284.43	580.27±270.14	0.369	469.20±168.21	440.62±150.38	0.218	0.315	0.063	0.082
*Insulina (µUI/mL)	1.19±0.21	1.16±0.19	0.710	1.16±0.24	1.16±0.18	0.978	0.743	0.608	0.729
*TT (ng/mL)	-0.46±0.42	-0.28±0.18	0.090	-	-	-	-	-	-

LH: Hormônio luteinizante; FSH: Hormônio foliculo estimulante; SDHEA: Sulfato de Dehidroepiandrosterona; 17OHP: 17-hidroxiprogesterona; 25(OH)D: 25-hidroxivitamina D; IGF-1: Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1; A=0: Androstenediona.

Dados expressos em média ± desvio padrão

a: Teste estatístico: Teste T de Student

b: Teste estatístico: Anova de duas vias

\* Variáveis transformadas para logaritmo

### 5.4.3. Análise do SNP FokI do gene do Receptor da Vitamina D

A distribuição do polimorfismo FokI CT apresenta-se em EHW na amostra total ( $\chi^2=0,09$ ), bem como no grupo PP ( $\chi^2=0,02$ ), e no grupo controle ( $\chi^2=0,07$ ). Para esse polimorfismo, uma paciente com PP não foi genotipada devido aos resultados negativos na amplificação da amostra com a metodologia utilizada.

As frequências genóticas e alélicas estão descritas na tabela 19. Não foi encontrada diferença estatística na distribuição dos genótipos ( $p=0,886$ ) e dos alelos (0,625) entre os grupos de estudo.

Tabela 19: Frequência dos genótipos do SNP Fok CT na amostra Total, Pubarca Precoce e Controle

Genótipo/Alelo	Todos n (%)	Pubarca Precoce n (%)	Controles n (%)	p
CC	94 (40.5)	13 (37.1)	81 (41.1)	0.886
CT	109 (47.0)	17 (48.6)	92 (46.7)	
TT	29 (12.5)	5 (14.3)	24 (12.2)	
C	297 (64.0)	43 (61.0)	254 (64.0)	0.625
T	167 (36.0)	27 (39.0)	140 (36.0)	

Teste estatístico do qui-quadrado

Analisamos as características clínicas, antropométricas, metabólicas e hormonais em relação aos genótipos agrupados pela presença do alelo recessivo (CC *versus* CT+TT). Nas tabelas 20 e 21 está demonstrado que não houve associação dessas variáveis com os grupos de estudo de acordo com os genótipos.

Tabela 20: Análise das variáveis antropométricas e clínicas das meninas com Pubarca Precoce e controles estratificadas pelos genótipos do SNP Fok I agrupado pela presença do alelo recessivo

Característica	Pubarca Precoce		Controle		p <sup>a</sup>	p <sup>a</sup>	P <sub>Gen</sub> <sup>b</sup>	P <sub>Diag</sub> <sup>b</sup>	P <sub>INT</sub> <sup>b</sup>
	CC (13)	CT + TT (22)	CC (81)	CT + TT (116)					
Idade (anos)	11.72±2.24	10.95±3.66	0.576	13.04±2.24	12.84±1.99	0.517	0.297	0.001	0.537
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	20.23±3.76	21.52±3.96	0.349	20.34±4.41	20.12±3.65	0.704	0.477	0.395	0.315
*IMC <sub>percentil</sub>	1.75±0.33	1.87±0.17	0.274	1.65±0.38	1.68±0.30	0.468	0.224	0.019	0.516
IMC <sub>scoreZ</sub>	0.58±1.00	1.06±0.92	0.169	0.25±1.05	0.27±0.92	0.880	0.185	0.003	0.225
Estágio Mamário	2.75±1.91	2.95±1.68	0.765	2.94±1.07	3.05±0.97	0.487	0.506	0.534	0.855
Estágio Pubiano	3.58±1.17	3.84±1.07	0.531	3.28±1.12	3.34±1.05	0.712	0.460	0.062	0.643
Id Pubarca (anos)	5.35±1.54	4.92±1.57	0.442	10.82±1.14	10.69±0.99	0.427	0.209	<0.001	0.496
Id Telarca (anos)	9.53±1.25	9.08±1.07	0.414	10.33±1.05	10.25±1.06	0.614	0.325	<0.001	0.491
Id Menarca (anos)	11.46±1.50	11.06±0.90	0.533	11.87±1.13	11.75±1.22	0.598	0.443	0.099	0.676
PN (Kg)	3.11±0.96	3.08±0.67	0.917	3.18±0.47	3.03±0.63	0.099	0.469	0.939	0.634

IMC: Índice de massa corporal; PN: peso ao nascimento

Dados expressos em média ± desvio padrão

\*Variáveis transformadas para logaritmo

a: Teste estatístico: Teste *T* de Student

b: Teste estatístico: Anova de duas vias

Tabela 21: Análise das variáveis metabólicas e hormonais das meninas com Pubarca Precoce e controles estratificadas pelos genótipos do SNP Fok I CT agrupado para presença do alelo recessivo

Característica	Pubarca Precoce		p <sup>a</sup>	Controle		p <sup>a</sup>	P <sub>Gen</sub> <sup>b</sup>	P <sub>Diag</sub> <sup>b</sup>	P <sub>INT</sub> <sup>b</sup>
	CC (13)	CT + TT (22)		CC (81)	CT + TT (116)				
*LH (mUI/mL)	0.02±0.97	0.05±0.81	0.923	0.31±0.72	0.34±0.67	0.743	0.819	0.033	0.989
*FSH (mUI/mL)	0.53±0.43	0.57±0.29	0.722	0.67±0.24	0.66±0.26	0.915	0.693	0.020	0.638
*Estradiol (pg/mL)	1.36±0.41	1.36±0.45	0.988	1.65±0.40	1.73±0.34	0.173	0.616	<0.001	0.638
*Estradiol s/menarca	1.14±0.36	1.27±0.46	0.517	1.45±0.41	1.49±0.35	0.650	0.399	0.012	0.655
*Estradiol c/menarca	1.67±0.24	1.57±0.43	0.650	1.80±0.33	1.83±0.28	0.574	0.714	0.038	0.491
*SDHEA (µg/dL)	2.08±0.42	2.07±0.33	0.940	1.85±0.29	1.87±0.30	0.677	0.944	<0.001	0.812
*17OHP (ng/mL)	-0.05±0.36	-0.15±0.37	0.508	-0.25±0.25	-0.21±0.26	0.294	0.637	0.022	0.235
25(OH)D (ng/mL)	20.14±8.68	16.66±8.04	0.295	21.16±6.64	21.35±7.32	0.847	0.277	0.059	0.223
*A=0 (ng/mL)	0.15±0.35	0.11±0.30	0.696	0.24±0.35	0.20±0.37	0.501	0.560	0.202	0.949
IGF-1(ng/mL)	474.15±300.65	531.16±273.54	0.646	446.48±155.92	460.39±162.58	0.555	0.381	0.225	0.594
*Insulina (µUI/mL)	1.13±0.24	1.22±0.15	0.279	1.13±0.20	1.17±0.22	0.221	0.140	0.637	0.520
*Testosterona Total (ng/mL)	-0.29±0.27	-0.45±0.38	0.193	-	-	-	-	-	-

LH: Hormônio luteinizante; FSH: Hormônio foliculo estimulante; SDHEA: Sulfato de Dehidroepiandrosterona; 17OHP: 17-hidroxiprogesterona; 25(OH)D: 25-hidroxivitamina D; IGF-1: Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1; A=0: Androstenediona.

Dados expressos em média ± desvio padrão

a: Teste estatístico: Teste *T* de Student

b: Teste estatístico: Anova de duas vias

\* Variáveis transformadas para logaritmo

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Caracterização da amostra de meninas com Pubarca Precoce e controles

No presente trabalho confirmou-se que meninas com PP apresentam frequência elevada de sobrepeso/obesidade e androgênios circulantes mais elevados (Accetta et al. 2004, Witchel 2006, Eyzaguirre et al. 2009, Ibanez et al. 2009, Ghizzoni and Gasco 2010), características que podem contribuir para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos em idade mais avançada. É descrito na literatura que o baixo peso ao nascer em meninas parece estar associado com níveis de androgênios circulantes mais elevados durante e após a puberdade e com a predisposição a desenvolver PP (Ong et al. 2004, Neville and Walker 2005). Esta associação não foi reproduzida com as participantes do nosso trabalho, semelhante ao observado em meninas finlandesas com adrenaemia prematura (Utriainen et al. 2009). No entanto, é importante enfatizar que o estudo não foi desenhado para investigar esta associação e, portanto, o tamanho amostral estimado pode não ter sido suficiente (em termos de poder estatístico) para encontrar tal associação.

Por outro lado, os níveis de estradiol foram inferiores nas PP, independente se elas já apresentassem ciclos menstruais ou não. No caso das meninas com PP antes da menarca, os níveis menores de estradiol provavelmente refletiram o fato de serem mais jovens e terem menor grau de desenvolvimento mamário que as controles (como observado pelo escore de Tanner para mamas). Com relação às meninas com PP após a menarca, a fase do ciclo menstrual no momento da coleta de amostras de soro pode ter influenciado nestes resultados. Embora as participantes com PP que tivessem ciclos regulares tenham coletado as amostras em fase folicular, as meninas do grupo controle realizaram as coletas a qualquer momento do ciclo, no momento da visita da equipe às escolas participantes.

No que se refere à deficiência/insuficiência de vitamina D, inúmeras evidências indicam que trata-se de um problema de saúde pública de amplitude mundial e, de forma semelhante ao descrito para diversas populações pediátricas e adolescentes (Harinarayan et al. 2008, Arabi et al. 2010, Delvin et al. 2010, Melamed and Kumar 2010), a hipovitaminose D foi bastante frequente na amostra estudada, atingindo valor superior ao

descrito para meninas adolescentes brasileiras da cidade de São Paulo (Peters et al. 2009). A média dos níveis séricos de 25(OH)D foi inferior à 30 ng/mL e somente 9.4% das participantes apresentaram níveis adequados de Vitamina D circulante.

Até o momento atual, parece não haver disponível na literatura estudos que tenham buscado avaliar o status de 25(OH)D em meninas com PP comparadas a controles saudáveis. Nós observamos que as meninas com PP possuem níveis circulantes desse esteróide inferiores aos encontrados nas controles e que a deficiência de vitamina D atinge mais de 50% dessas meninas. Esse achado poderia estar relacionado ao fato de as meninas com PP apresentarem valores do percentual de IMC mais elevados do que o grupo controle, apesar de não ter havido correlação entre níveis de 25(OH)D e os percentis ou score Z de IMC, seja na amostra total ou nos grupos individualmente. Diferenças étnicas e de exposição solar também merecem ser consideradas, pois embora oriundas da mesma região sul do Brasil, as controles são oriundas do Paraná e as meninas com PP provém do RS.

Inúmeros estudos vêm demonstrando que os níveis de vitamina D são inferiores em indivíduos com sobrepeso/obesidade, inversamente associados com pressão arterial, RI, insulina e glicose em jejum (Reinchr et al. 2007, Alemzadeh et al. 2008, Ashraf et al. 2009, Reis et al. 2009, Delvin et al. 2010, Johnson et al. 2010). Assim, baixos níveis de Vitamina D podem influenciar no risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular. Em pacientes com PCOS as evidências também sugerem que haja associação entre deficiência de vitamina D com resistência insulínica e obesidade central (Hahn et al. 2006, Wehr et al. 2009, Yildizhan et al. 2009), embora haja discrepâncias quanto a diferenças nos níveis de vitamina D entre controles e PCOS ou hirsutismo (Mahmoudi et al. 2010, Glintborg et al. 2005).

No presente estudo, não foram observadas associações entre níveis de 25(OH)D e variáveis antropométricas, hormonais ou metabólicas, como têm sido encontrado em populações adultas. Ainda que meninas com PP possam ter maior probabilidade de desenvolver comorbidades metabólicas e PCOS em idade reprodutiva (Ibanez et al. 1993, Vuguin et al. 1999, Evliyaoglu et al. 2007), essas alterações podem não ser clinicamente evidentes em idade peripuberal, agravando-se com o avanço da idade cronológica. É possível que este seja o caso das participantes com PP, e o seguimento destas meninas permitirá confirmar esta possibilidade no futuro. Por outro lado, relatos descritos na literatura mostram a presença destas alterações em adolescentes com deficiência em vitamina D. Em estudo com meninas obesas com idade média de 14 anos, apresentando ciclos menstruais e deficiência em vitamina D, foi observada uma sensibilidade insulínica diminuída e AUC de insulina mais elevada, (Ashraf et al. 2009). Em adolescentes americanos com idade média de 15,4 anos foi verificado um risco relativo de 3,88 (95% Intervalo de Confiança: 1,57–9,58)

para síndrome metabólica para os indivíduos com níveis de Vitamina D menores que 15ng/mL, independente da adiposidade (Reis et al. 2009).

## 6.2. Polimorfismo -71AG da 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 5 (17 $\beta$ HSD5)

O polimorfismo -71AG localiza-se na região promotora do gene da 17 $\beta$ HSD5 e corresponde a troca de uma Adenina (A) por uma Guanina (G), o alelo A é considerado o ancestral pelo *Reference SNP* (refSNP). e sua frequência é dominante na grande maioria das populações. Da mesma forma, de acordo com os dados fornecidos pelo HapMap (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>), o genótipo AA é dominante em praticamente todas as populações. Nossos dados de frequência genotípica se assemelham com as descritas para populações com descendência europeia e africana.

Apesar de não termos encontrado associação do polimorfismo -71AG do gene da 17 $\beta$ HSD5 com o diagnóstico de PP, verificamos que o alelo variante G é mais frequente nesse grupo de meninas quando comparado ao controle, porém sem diferença significativa. As frequências genotípicas encontradas no presente estudo, para as PP, estão de acordo com aquelas descritas para meninas espanholas com PP, em estudo de casos e controles (190 PP e 71 controles) onde também não foi encontrada associação desse SNP com PP, hiperandrogenemia ou hiperandrogenismo (Petry et al. 2007). Esse polimorfismo encontra-se associado com PCOS caucasianas (Qin et al. 2006), porém os achados referentes a essa associação são inconclusivos, uma vez que estudos mais recentes referem falta de associação entre o polimorfismo e a patologia (Goodarzi et al. 2008, Marioli et al. 2009). Esses dados contraditórios podem ser um reflexo da natureza poligênica da PCOS, sugerindo que polimorfismos genéticos podem contribuir de forma distinta para a fisiopatologia da síndrome.

O SNP -71AG se localiza próximo ao local de iniciação da transcrição de gene e a poucos pares de base do local de ligação aos elementos responsivos da região promotora do gene *HSD17B5* (Qin and Rosenfield 2005), sugerindo sua possível participação no controle da expressão gênica do *HSD17B5*. Sendo assim, o alelo G estaria associado ao aumento da atividade da região promotora do gene e, poderia contribuir com o aumento dos níveis de testosterona plasmática e com a diminuição da relação androstenediona/testosterona nas pacientes com PCOS (Qin et al. 2006, Marioli et al. 2009), sugerindo que essa variação não é o principal componente do mecanismo molecular patogênico de PCOS, mas que poderia contribuir para a hiperandrogenemia nessas pacientes.

Como observou-se, no presente estudo, que o alelo variante G não foi significativamente mais frequente no grupo de meninas com PP quando comparadas às controles, é preciso considerar o porquê da dissociação deste resultado com a ausência de associação dessa variante genética com o diagnóstico de PP ou com níveis de androgênios circulantes. Um dos fatores pode estar relacionado ao tamanho amostral, que não obteve poder estatístico suficiente para evidenciar tais associações. Isso pode ter ocorrido por que o tamanho da amostra foi estimado para verificar associação entre PP e polimorfismos da vitamina D, em que havia dados mais consistentes de associação com PCOS. Além disso, devem ser consideradas as diferenças étnicas das pacientes incluídas no estudo atual e naqueles avaliando PCOS, uma vez que associações entre variantes genéticas e fenótipos clínicos podem ser específicas para cada população. Como exemplo, em mulheres PCOS chinesas, esse polimorfismo se mostrou bastante raro, onde somente uma paciente apresentou a presença do alelo G (genótipo AG) (Ke et al. 2010) e, em mulheres gregas, a frequência do genótipo GG nas pacientes controles foi de apenas 2% (Marioli et al. 2009).

### **6.3. Polimorfismos do gene do Receptor da Vitamina D**

#### **6.3.1. SNP Apal TG do gene do Receptor da Vitamina D**

O polimorfismo Apal TG localiza-se no intron 8 e corresponde a troca de uma Timina (T) por uma Guanina (G). Embora o alelo T seja mais frequente em nossa amostra e em outros estudos, o alelo G é considerado o ancestral pelo *Reference SNP* (refSNP). De acordo com os dados fornecidos pelo HapMap (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>), as frequências genotípicas desse polimorfismo variam de população para população, sendo nas de origem européia e nas de origem africana o genótipo heterozigoto TG o mais frequente, já para os de origem asiática o genótipo GG é mais frequente. As frequências encontradas no presente estudo se assemelham as descritas para indivíduos europeus e africanos.

Pelo nosso conhecimento, são inexistentes estudos que tenham buscado avaliar polimorfismos do VDR em meninas acometidas por PP e controles saudáveis. Nós verificamos que a presença em homozigose do alelo variante G (genótipo GG) pode conferir um risco relativo de 2.269 para PP.

Estudos com Diabetes descreveram uma maior frequência do genótipo GG nos indivíduos que possuem Diabetes Melito tipo 2, porém não significativo (Oh and Barrett-

Connor 2002, Nosratabadi et al. 2010). Por outro lado, em indivíduos caucasianos gregos, com Diabetes Mellito tipo 1, o genótipo GG apresenta-se como um fator de proteção para o diagnóstico, sendo mais frequente no grupo controle (Panierakis et al. 2009). Somando-se a esses achados, é observada associação entre esse polimorfismo com níveis mais elevados de glicose em jejum e de intolerância a glicose (Oh and Barrett-Connor 2002) e, com maior secreção de insulina (Hitman et al. 1998). Apenas um estudo iraniano mostrou maior frequência do genótipo GG deste polimorfismo do VDR com PCOS em relação a controles saudáveis, independente da idade e do IMC (Mahmoudi 2009).

Em nosso estudo o genótipo GG do SNP Apal associou-se também com níveis mais baixos de estradiol e testosterona total nas meninas com PP. Esse parece ser o primeiro trabalho a relatar associação desse polimorfismo com hormônios sexuais. Estudo com 56 mulheres com PCOS, indicou associação de outros polimorfismos do VDR com parâmetros hormonais, mas que não incluem testosterona total e estradiol (Ranjzad et al. 2011).

Vários trabalhos sugerem uma possível ação da Vitamina D sobre a regulação da expressão e atividade de enzimas chaves para biossíntese de hormônios sexuais. Em camundongos transgênicos sem o VDR, foi observada insuficiência gonadal e alterações na foliculogênese. Além disso, a atividade da aromatase ovariana e sua expressão gênica foram menores nestes camundongos, quando comparadas aos camundongos controles (com o VDR). Quando os níveis plasmáticos de cálcio foram corrigidos, através de suplementação, a atividade da aromatase ovariana aumentou até 60% da atividade observada nos camundongos selvagens (Kinuta et al. 2000). Em cultura primária de osteoblastos humanos, foi verificado que a adição ao meio de cultura de calcitriol, isolado ou junto com dexametasona, estradiol ou testosterona, elevaram os níveis de expressão gênica aromatase (Enjuanes et al. 2003). Outro estudo experimental demonstrou que o tratamento das células em cultura com vitamina D diminuiu a expressão da aromatase em células mamárias humanas cancerosas e pré-adipócitos de ratos (Krishnan et al. 2010). Esses achados, em conjunto, sugerem que a vitamina D pode regular a expressão gênica da aromatase de forma seletiva, de acordo com o tecido e, sustentam a hipótese de que esse hormônio e o VDR possam exercer um papel na fisiopatologia das disfunções endócrinas relacionadas com o metabolismo dos hormônios sexuais, como PP e PCOS.

Em nosso trabalho, o mesmo genótipo que foi associado com o risco de desenvolvimento de PP (genótipo GG) foi associado, nas meninas com PP, com a diminuição dos níveis séricos de estradiol e testosterona. No entanto, os níveis de S-DHEA, androgênio de origem adrenal, que caracteristicamente se encontra aumentado nas meninas com PP, não apresentou diferença entre os genótipos. Este dado sugere que a eventual influência do polimorfismo Apal TG esteja relacionada mais à secreção de

esteroides ovarianos e não diretamente com aspectos fisiopatológicos relacionados com PP e esteroidogênese adrenal.

### 6.3.2. SNPs TaqI TC e BsmI GA do gene do Receptor da Vitamina D

O polimorfismo TaqI TC localiza-se no éxon 9 e corresponde a troca de uma Timina (T) por uma Citosina (C), o alelo T é considerado o ancestral pelo *Reference SNP* (refSNP) e sua frequência é dominante na imensa maioria das populações. Da mesma forma, de acordo com os dados fornecidos pelo HapMap (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>), o genótipo TT é dominante em praticamente todas as populações. Nossos dados de frequência genotípica se assemelham com as descritas para a população com descendência africana.

O SNP BsmI GA encontra-se no intron 8 e corresponde a troca de uma Guanina (G) por uma Adenina (A). No *Reference SNP* (refSNP) é descrito o alelo G como ancestral e encontra-se em frequências superiores a do alelo A em praticamente todas as populações. Porém, a frequência dos genótipos varia de acordo com a população, nas de origem europeia o genótipo heterozigoto é mais frequente, enquanto que entre as asiáticas e africanas o genótipo homozigoto GG é dominante (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). Nossas frequências estão de acordo com as descritas para a população com descendência africana.

Nenhum dos dois polimorfismos apresentou diferenças na distribuição genotípica entre PP e controles, nem associação com variáveis clínicas, antropométricas ou metabólicas, embora haja relatos na literatura com populações adultas relacionando o genótipo GG do SNP BsmI GA com valores de HOMA-IR mais elevados em uma coorte de indivíduos não diabéticos (Oh and Barrett-Connor 2002). Outro estudo, com indivíduos que possuem pouca atividade física semanal, mostrou associação do genótipo AA com glicemia em jejum mais elevada (Ortlepp et al. 2003). Finalmente, estudo com brasileiros com Diabetes Mellito tipo 1, relatou que o SNP BsmI GA não foi associado a nenhum parâmetro clínico ou metabólico analisado (Mory et al. 2009).

Com relação ao SNP TaqI TC, este tem sido sugerido como um fator preditor independente para resistência insulínica, e a presença do genótipo CC associa-se a maiores níveis de secreção desse hormônio (Ogunkolade et al. 2002). Por outro lado, não foi verificada a associação desse polimorfismo com alterações no perfil lipídico, glicose em jejum ou histórico familiar de Diabetes (Dilmec et al. 2010).

No presente estudo verificamos que a presença do alelo polimórfico, de ambos os SNPs, se associou com os níveis mais elevados de 25(OH)D, quando avaliadas apenas o grupo de meninas saudáveis. No mesmo sentido, observamos que a frequência de deficiência de vitamina D (<20 ng/mL) foi menor na presença dos polimorfismos TaqI TC (genótipo TC+CC) e BsmI GA (genótipo GA+AA).

São escassos na literatura estudos que relacionem esses polimorfismos com concentrações de 25(OH)D em amostra de indivíduos saudáveis. Em 2010 uma pesquisa realizada com 415 indivíduos americanos saudáveis com média de 65 anos, que avaliou 42 SNPs do VDR, entre eles o TaqI TC e BsmI GA, não encontrou associação de nenhum dos 42 polimorfismos avaliados com os níveis séricos de 25(OH)D ou 1,25(OH)<sub>2</sub>D (Hibler et al. 2010). Estudo com 94 participantes indianos de origem asiática, saudáveis, também não encontrou associação desses SNPs com níveis de vitamina D (Vupputuri et al. 2006). Um fator limitante do estudo de Hibler e colaboradores, é que a amostra envolve indivíduos com sobrepeso, o que pode ser um fator de confusão em relação aos níveis de vitamina D. Além disso, abrange indivíduos idosos e muitos utilizam suplementação de Vitamina D, o que pode estar interferindo nos níveis de atividade e exposição solar e concentrações basais do esteróide. Já no trabalho de Vupputuri e colaboradores se observa uma média de Vitamina D muito baixa ( $9.8 \pm 6.0$  ng/mL), além da idade média da amostra ser de aproximadamente 43 anos e incluir muitos indivíduos que trabalham por muitas horas em ambientes fechados. Nesses estudos não são mencionados cuidados com a sazonalidade da coleta, enquanto em nosso trabalho as amostras do grupo controle foram coletadas em épocas do ano com similar incidência solar (outono e primavera).

Apenas um trabalho foi encontrado na literatura avaliando esses polimorfismos com vitamina D em PCOS. Nesse, os SNPs TaqI TC e BsmI GA (genótipos TT e GG, respectivamente) foram associados com níveis séricos de 25(OH)D mais elevados em pacientes acometidas por PCOS (Mahmoudi 2009). Porém, trata-se de um estudo pequeno, descrito de forma sucinta, onde não se tem os valores médios das concentrações de 25(OH)D nem a descrição dos possíveis fatores de confusão. Ainda assim, é preciso assinalar que nossos achados são em meninas saudáveis, e esses polimorfismos podem exercer influência de forma diferenciada em pacientes com PCOS. Ainda em PCOS, numa amostra de 56 mulheres, o SNP TaqI TC (genótipo CC) foi associado com níveis mais elevados de LH e SNP BsmI GA (genótipo GG) com níveis mais baixos de SHBG, sugerindo que a presença desse genótipo pode estar contribuindo para o aumento dos níveis de androgênios livres e conseqüentemente com a hiperandrogenemia, muitas vezes presente nesse grupo de mulheres (Ranjzad et al. 2011).

### 6.3.3. SNP FokI CT do gene do Receptor da Vitamina D

O SNP FokI TC está localizado no éxon 2 e corresponde a troca de uma Citosina (C) por uma Timina (T). Trata-se de um polimorfismo *missence* (quando altera o aminoácido sintetizado), onde sua ocorrência gera a formação de um códon de iniciação (ATG) suplementar a uma distância de três códons do sítio de iniciação natural do gene, traduzindo proteínas de tamanhos distintos, de 424 aminoácidos na presença do alelo T e de 427 aminoácidos na presença do alelo C. O alelo T é considerado o ancestral pelo *Reference SNP* (refSNP), embora ele apresente menor frequência que o alelo C em diversas populações e no presente estudo. Da mesma maneira, o genótipo TT é o menos frequente nos dados descritos pelo HapMap (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) e nos resultados da amostra avaliada nesse estudo.

No presente trabalho não encontramos associação do SNP FokI CT com PP, da mesma forma foi detectada a ausência de associação do polimorfismo com os parâmetros clínicos, antropométricos, metabólicos e hormonais. Essa variante genética é amplamente estudada, pois segundo alguns autores, a presença desse SNP pode alterar as propriedades funcionais do receptor. Alguns estudos demonstram que a forma protéica curta (originada na presença no alelo T) possui maior atividade de transcrição que a forma longa curta (originada na presença no alelo C) (Valdivielso and Fernandez 2006, McGrath et al. 2010).

Outros estudos, buscam avaliar esse polimorfismo em relação aos níveis de Vitamina D. Um trabalho com amostra de indivíduos saudáveis, com idade média de 43,3 anos e IMC de 24,6, demonstra que esse polimorfismo não se associa com os níveis de 25(OH)D (Vupputuri et al. 2006). Por outro lado, o alelo T desse SNP parece estar associado com níveis mais elevados desse esteróide, segundo uma revisão sistemática publicada em 2010 (McGrath et al. 2010), resultado que não conseguimos evidenciar em nossa amostra.

Em mulheres acometidas por PCOS, foi verificado que o genótipo homozigoto dominante (CC) pode estar associado com IMC mais elevado e pode conferir risco para aumento dos níveis séricos de insulina e RI (Mahmoudi 2009, Ranjzad et al. 2011).

Em indivíduos com Diabetes tipo 1, os dados ainda são inconclusivos a respeito desse polimorfismo. Em indivíduos gregos o alelo T é significativamente mais frequente nos sujeitos doentes do que nos controles saudáveis (Panierakis et al. 2009), diferente dos dados encontrados na população espanhola, onde o alelo T apresentou-se com mais frequência nos indivíduos saudáveis (Audi et al. 2004). Além disso, esses achados não foram replicados em estudo realizado no Brasil que compreendeu 189 em pacientes e 194

controles, onde não foi observada a associação do SNP FokI CT com Diabetes tipo 1 (Mory et al. 2009).

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- 1- Observou-se maior frequência do alelo variante G SNP -71 AG do gene da 17 $\beta$ HSD5, com uma associação limítrofe desse alelo com o diagnóstico clínico de PP. No entanto, não houve associação entre este polimorfismo e características clínicas e hormonais em amostra de meninas com e sem PP.
- 2- As meninas com PP apresentaram níveis séricos de 25 (OH)D inferiores aos das meninas saudáveis.
- 3- O genótipo GG do polimorfismo Apal TG do VDR foi associado com PP e com níveis de testosterona e estradiol mais baixos nessas meninas, sugerindo que esse polimorfismo pode estar modulando os processos esteroidogênicos ovarianos em meninas com PP.
- 4- Os SNPs TaqI TC e BsmI GA do VDR apresentaram associação com os níveis séricos de Vitamina D nas meninas do grupo controle, sugerindo uma possível interação entre esses polimorfismos e mecanismos regulatórios da secreção de vitamina D em meninas saudáveis do sul do Brasil.
- 5- Não foram observadas diferenças na distribuição genotípica ou alélica do SNP FokI CT entre PP e controles e tampouco associações com variáveis clínicas, antropométricas, hormonais ou metabólicas estudadas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accetta, S. G., K. De Domenico, C. G. Ritter, A. T. Ritter, E. Capp & P. M. Spritzer (2004) Anthropometric and endocrine features in girls with isolated premature pubarche or non-classical congenital adrenal hyperplasia. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 17, 767-773.
- Alemzadeh, R., J. Kichler, G. Babar & M. Calhoun (2008) Hypovitaminosis D in obese children and adolescents: relationship with adiposity, insulin sensitivity, ethnicity, and season. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 57, 183-191.
- Alvarez, J. A. & A. Ashraf (2010) Role of Vitamin D in Insulin Secretion and Insulin Sensitivity for Glucose Homeostasis. *International Journal of Endocrinology*, 18.
- Alvarez, J. A., A. P. Ashraf, G. R. Hunter & B. A. Gower (2010) Serum 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone are independent determinants of whole-body insulin sensitivity in women and may contribute to lower insulin sensitivity in African Americans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 92, 1344-1349.
- Andersson, S., D. W. Russell & J. D. Wilson (1996) 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 7, 121-126.
- Arabi, A., R. El Rassi & G. E. H. Fuleihan (2010) Hypovitaminosis D in developing countries-prevalence, risk factors and outcomes. *Nature Reviews Endocrinology*, 6, 550-561.
- Ashraf, A., J. Alvarez, K. Saenz, B. Gower, K. McCormick & F. Franklin (2009) Threshold for Effects of Vitamin D Deficiency on Glucose Metabolism in Obese Female African-American Adolescents. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94, 3200-3206.
- Auchus, R. J. & W. E. Rainey (2004) Adrenarche - physiology, biochemistry and human disease. *Clinical Endocrinology*, 60, 288-296.
- Audi, L., G. Marti, C. Esteban, M. Oyarzabal, M. Chueca, M. Gussinye, D. Yeste, M. Fernandez-Cancio, P. Andaluz & A. Carrascosa (2004) VDR gene polymorphism at exon 2 start codon (FokI) may have influenced Type 1 diabetes mellitus susceptibility in two Spanish populations. *Diabetic Medicine*, 21, 393-394.
- Bland, R., D. Markovic, C. E. Hills, S. V. Hughes, S. L. F. Chan, P. E. Squires & M. Hewison (2004) Expression of 25-hydroxyvitamin D-3-1 alpha-hydroxylase in pancreatic islets. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 89-90, 121-125.
- Bleau, G., K. D. Roberts & Chapdelaine A (1974) In vitro and in vivo uptake and metabolism of steroids in human adipose-tissue. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 39, 236-246.
- Blouin, K., M. Nadeau, J. Mailloux, M. Daris, S. Lebel, L.-T. Van & A. Tchernof (2009) Pathways of adipose tissue androgen metabolism in women: depot differences and modulation by adipogenesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296, E244-E255.

- Bojikian, L. P., M. Massa, R. H. C. Martin, C. P. Texeira, M. A. P. D. Kiss & M. T. S. Bohme (2002) Auto-avaliação puberal feminina por meio da utilização de desenhos e fotos. *Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde*, 7, 24 - 34.
- Boucher, B. J. (1998) Inadequate vitamin D status: does it contribute to the disorders comprising syndrome 'X'? *British Journal of Nutrition*, 79, 315-327.
- Brumbaugh, P. F. & M. R. Haussler (1974) 1 alfa,25-dihidroxycholecalciferol receptors in intestine .1. Association of 1 alfa,25-dihidroxycholecalciferol with intestinal-mucosa chromatin. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 1251-1257.
- Casey, M. L., P. C. Macdonald & S. Andersson (1994) 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type-2 - Chromosomal assignment and progesterone regulation of gene-expression in human endometrium. *Journal of Clinical Investigation*, 94, 2135-2141.
- Cole, T. J., M. C. Bellizzi, K. M. Flegal & W. H. Dietz (2000) Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *British Medical Journal*, 320, 1240-1243.
- Delvin, E. E., M. Lambert, E. Levy, J. O'Loughlin, S. Mark, K. Gray-Donald & G. Paradis (2010) Vitamin D Status Is Modestly Associated with Glycemia and Indicators of Lipid Metabolism in French-Canadian Children and Adolescents. *Journal of Nutrition*, 140, 987-991.
- Dilmec, F., E. Uzer, F. Akkafa, E. Kose & A. B. P. van Kuilenburg (2010) Detection of VDR gene Apal and Taql polymorphisms in patients with type 2 diabetes mellitus using PCR-RFLP method in a Turkish population. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 24, 186-191.
- DiMartino-Nardi, J. (1998) Insulin resistance in prepubertal African-American and Hispanic girls with premature adrenarche: A risk factor for polycystic ovary syndrome. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 9, 78-82.
- Dufort, I., P. Rheault, X. F. Huang, P. Soucy & V. Luu-The (1999) Characteristics of a highly labile human type 5 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology*, 140, 568-574.
- Dusso, A. S., A. J. Brown & E. Slatopolsky (2005) Vitamin D. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 289, F8-F28.
- El-Alfy, M., V. Luu-The, X. F. Huang, L. Berger, F. Labrie & G. Pelletier (1999) Localization of type 5 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by in situ hybridization and immunocytochemistry. *Endocrinology*, 140, 1481-1491.
- Enjuanes, A., N. Garcia-Giralt, A. Supervia, X. Nogues, L. Mellibovsky, J. Carbonell, D. Grinberg, S. Balcells & A. Diez-Perez (2003) Regulation of CYP19 gene expression in primary human osteoblasts: effects of vitamin D and other treatments. *European Journal of Endocrinology*, 148, 519-526.
- Evliyaoglu, O., M. Berberoglu, P. Adiyaman, Z. Aycan & G. Ocal (2007) Evaluation of insulin resistance in Turkish girls with premature pubarche using the homeostasis assessment (HOMA) model. *Turkish Journal of Pediatrics*, 49, 165-170.
- Eyzaguirre, F. C., R. Bancalari, R. Youlton, R. Roman, R. Silva, H. Garcia & V. Mericq (2009) Precocious pubarche: Experience in 173 cases. *Revista Medica De Chile*, 137, 31-38.
- Ferriman, D. & J. D. Gallwey (1961) Clinical assessment of body hair growth in women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 21, 1440-&.
- George, M. M., M. I. New, S. Ten, C. Sultan & A. Bhangoo (2010) The Clinical and Molecular Heterogeneity of 17 beta HSD-3 Enzyme Deficiency. *Hormone Research in Paediatrics*, 74, 229-240.
- Gharaibeh, M. A. & B. J. Stoecker (2009) Assessment of serum 25(OH)D concentration in women of childbearing age and their preschool children in Northern Jordan during summer. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63, 1320-1326.
- Ghizzoni, L. & V. Gasco (2010) Premature Pubarche. *Hormone Research in Pediatrics*, 73, 420-422.

- Glintborg, D., M. Andersen, C. Hagen & A. P. Hermann (2005) Higher bone mineral density in Caucasian, hirsute patients of reproductive age. Positive correlation of testosterone levels with bone mineral density in hirsutism. *Clinical Endocrinology*, 62, 683-691.
- Goodarzi, M. O., M. R. Jones, H. J. Antoine, M. Pall, Y. D. I. Chen & R. Azziz (2008) Nonreplication of the type 5 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene association with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93, 300-303.
- Hahn, S., U. Haselhorst, S. Tan, B. Quadbeck, M. Schmidt, S. Roesler, R. Kimmig, K. Mann & O. E. Janssen (2006) Low serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with insulin resistance and obesity in women with polycystic ovary syndrome. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 114, 577-583.
- Harinarayan, C. V., T. Ramalakshmi, U. V. Prasad & D. Sudhakar (2008) Vitamin D status in andhra pradesh: A population based study. *Indian Journal of Medical Research*, 127, 211-218.
- Haussler, M. R., G. K. Whitfield, C. A. Haussler, J. C. Hsieh, P. D. Thompson, S. H. Selznick, C. E. Dominguez & P. W. Jurutka (1998) The nuclear vitamin D receptor: Biological and molecular regulatory properties revealed. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13, 325-349.
- He, C., P. Kraft, D. I. Chasman, J. E. Buring, C. Chen, S. E. Hankinson, G. Pare, S. Chanock, P. M. Ridker & D. J. Hunter (2010) A large-scale candidate gene association study of age at menarche and age at natural menopause. *Human Genetics*, 128, 515-527.
- He, J. H., Q. Q. Cheng & W. Xie (2010) Minireview: Nuclear Receptor-Controlled Steroid Hormone Synthesis and Metabolism. *Molecular Endocrinology*, 24, 11-21.
- Hibler, E. A., P. W. Jurutka, J. B. Egan, C. Hu, E. C. Leroy, M. E. Martinez, P. A. Thompson & E. T. Jacobs (2010) Association between polymorphic variation in VDR and RXRA and circulating levels of vitamin D metabolites. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 121, 438-441.
- Hitman, G. A., N. Mannan, M. F. McDermott, E. Aganna, B. W. Ogunkolade, C. N. Hales & B. J. Boucher (1998) Vitamin D receptor gene polymorphisms influence insulin secretion in Bangladeshi Asians. *Diabetes*, 47, 688-690.
- Holick, M. F. (2007) Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine*, 357, 266-281.
- Holick, M. F. & H. F. Deluca (1974) Vitamin-D Metabolism. *Annual Review of Medicine*, 25, 349-367.
- Ibanez, L., R. Diaz, A. Lopez-Bermejo & M. Marcos (2009) Clinical spectrum of premature pubarche: Links to metabolic syndrome and ovarian hyperandrogenism. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 10, 63-76.
- Ibanez, L., A. Lopez-Bermejo, M. Diaz, M. V. Marcos & F. de Zegher (2011) Early metformin therapy to delay menarche and augment height in girls with precocious pubarche. *Fertility and Sterility*, 95, 727-730.
- Ibanez, L., K. K. Ong, N. Mongan, J. Jaaskelainen, M. V. Marcos, I. A. Hughes, F. De Zegher & D. B. Dunger (2003) Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism in the development of ovarian hyperandrogenism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88, 3333-3338.
- Ibanez, L., N. Potau, K. Ong, D. B. Dunger & F. De Zegher (2000) Increased bone mineral density and serum leptin in non-obese girls with precocious pubarche: Relation to low birthweight and hyperinsulinism. *Hormone Research*, 54, 192-197.
- Ibanez, L., N. Potau, R. Viridis, M. Zampolli, C. Terzi, M. Gussinye, A. Carrascosa & E. Vicenscalvet (1993) Postpubertal outcome in girls diagnosed of premature pubarche during childhood - increased frequency of functional ovarian hyperandrogenism. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 76, 1599-1603.
- Ibanez, L., C. Valls, N. Potau, M. V. Marcos & F. de Zegher (2001) Polycystic ovary syndrome after precocious pubarche: ontogeny of the low-birthweight effect. *Clinical Endocrinology*, 55, 667-672.

- Ibanez, L., R. Virdis, N. Potau, M. Zampolli, L. Ghizzoni, M. A. Albisu, A. Carrascosa, S. Bernasconi & E. Vicenscalvet (1992) Natural history of premature pubarche - An auxological study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 74, 254-257.
- Jacobsohn, G. M. & R. B. Hochberg (1968) 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase from human red blood cells. *Journal of Biological Chemistry*, 243, 2985-&.
- Johnson, M. D., N. S. Nader, A. L. Weaver, R. Singh & S. Kumar (2010) Relationships between 25-Hydroxyvitamin D Levels and Plasma Glucose and Lipid Levels in Pediatric Outpatients. *Journal of Pediatrics*, 156, 444-U146.
- Ke, L., Y. N. Che, Y. X. Cao, X. K. Wu, Y. L. Hu, H. X. Sun, F. J. Liang, J. Sun, L. Yi & Y. Wang (2010) Polymorphisms of the HSD17B6 and HSD17B5 Genes in Chinese Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Journal of Womens Health*, 19, 2227-2232.
- Kinuta, K., H. Tanaka, T. Moriwake, K. Aya, S. Kato & Y. Seino (2000) Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology*, 141, 1317-1324.
- Krishnan, A. V., S. Swami & D. Feldman (2010) Vitamin D and breast cancer: Inhibition of estrogen synthesis and signaling. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 121, 343-348.
- Kuczumski, R. J., C. L. Ogden, L. M. Grummer-Strawn, K. M. Flegal, S. S. Guo, R. Wei, Z. Mei, L. R. Curtin, A. F. Roche & C. L. Johnson (2000) CDC growth charts: United States. *Advance data from vital and health statistics of the Centers for Disease Control and Prevention/National Center for Health Statistics.*, 1 - 27.
- Luu-The, V., I. Dufort, G. Pelletier & F. Labrie (2001) Type 5 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: its role in the formation of androgens in women. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 171, 77-82.
- MacKenzie, S. M., S. S. Huda, N. Sattar, R. Fraser, J. M. C. Connell & E. Davies (2008) Depot-specific steroidogenic gene transcription in human adipose tissue. *Clinical Endocrinology*, 69, 848-854.
- Madar, A. A., L. C. Stene & H. E. Meyer (2009) Vitamin D status among immigrant mothers from Pakistan, Turkey and Somalia and their infants attending child health clinics in Norway. *British Journal of Nutrition*, 101, 1052-1058.
- Mahmoudi, T. (2009) Genetic variation in the vitamin D receptor and polycystic ovary syndrome risk. *Fertility and Sterility*, 92, 1381-1383.
- Mahmoudi, T., H. Gourabi, M. Ashrafi, R. S. Yazdi & Z. Ezabadi (2010) Calcitropic hormones, insulin resistance, and the polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 93, 1208-1214.
- Maliqueo, M., T. Sir-Petermann, V. Perez, B. Echiburru, A. L. de Guevara, C. Galvez, N. Crisosto & R. Azziz (2009) Adrenal Function during Childhood and Puberty in Daughters of Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94, 3282-3288.
- Mangelsdorf, D. J. & R. M. Evans (1995) THE RXR HETERODIMERS AND ORPHAN RECEPTORS. *Cell*, 83, 841-850.
- Marioli, D. J., A. D. Saltamavros, V. Vervita, V. Koika, G. Adonakis, G. Decavalas, K. B. Markou & N. A. Georgopoulos (2009) Association of the 17-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 gene polymorphism (-71A/G HSD17B5 SNP) with hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome (PCOS). *Fertility and Sterility*, 92, 648-652.
- Marshall, W. A. & J. M. Tanner (1969) Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Archives of Disease in Childhood*, 44, 291-&.
- Matsudo, S. M. M. & V. K. R. Matsudo (1994) Self-assessment and physician assessment of sexual-maturation in brazilian boys and girls - Concordance and reproducibility. *American Journal of Human Biology*, 6, 451-455.
- McGrath, J. J., S. Saha, T. H. J. Burne & D. W. Eyles (2010) A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 121, 471-477.

- Mei, Z. G., L. M. Grummer-Strawn, A. Pietrobelli, A. Goulding, M. I. Goran & W. H. Dietz (2002) Validity of body mass index compared with other body-composition screening indexes for the assessment of body fatness in children and adolescents. *American Journal of Clinical Nutrition*, 75, 978-985.
- Melamed, M. L. & J. Kumar (2010) Low levels of 25-hydroxyvitamin D in the pediatric populations: prevalence and clinical outcomes. *Pediatric Health*, 4, 89-97.
- Mendonca, B. B., I. J. P. Arnhold, W. Bloise, S. Andersson, D. W. Russell & J. D. Wilson (1999) 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency in women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84, 802-804.
- Miller, S. A., D. D. Dykes & H. F. Polesky (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16, 1215-1215.
- Miyamoto, K., R. A. Kesterson, H. Yamamoto, Y. Taketani, E. Nishiwaki, S. Tatsumi, Y. Inoue, K. Morita, E. Takeda & J. W. Pike (1997) Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Molecular Endocrinology*, 11, 1165-1179.
- Mory, D. B., E. R. Rocco, W. L. Miranda, T. Kasamatsu, F. Crispim & S. A. Dib (2009) Prevalence of vitamin D receptor gene polymorphisms FokI and BsmI in Brazilian individuals with type 1 diabetes and their relation to beta-cell autoimmunity and to remaining beta-cell function. *Human Immunology*, 70, 447-451.
- Nakamura, Y., P. J. Hornsby, P. Casson, R. Morimoto, F. Satoh, Y. W. Xing, M. R. Kennedy, H. Sasano & W. E. Rainey (2009) Type 5 17 beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase (AKR1C3) Contributes to Testosterone Production in the Adrenal Reticularis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94, 2192-2198.
- Neville, K. A. & J. L. Walker (2005) Precocious pubarche is associated with SGA, prematurity, weight gain, and obesity. *Archives of Disease in Childhood*, 90, 258-261.
- Nosratabadi, R., M. K. Arababadi, V. A. Salehabad, A. Shamsizadeh, M. Mahmoodi, A. R. Sayadi & D. Kennedy (2010) Polymorphisms within exon 9 but not intron 8 of the vitamin D receptor are associated with the nephropathic complication of type-2 diabetes. *International Journal of Immunogenetics*, 37, 493-497.
- Ogunkolade, B. W., B. J. Boucher, J. M. Prael, S. A. Bustin, J. M. Burrin, K. Noonan, B. V. North, N. Mannan, M. F. McDermott, H. F. DeLuca & G. A. Hitman (2002) Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians. *Diabetes*, 51, 2294-2300.
- Oh, J. Y. & E. Barrett-Connor (2002) Association between vitamin D receptor polymorphism and type 2 diabetes or metabolic syndrome in community-dwelling older adults: The Rancho Bernardo Study. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 51, 356-359.
- Ong, K. K., N. Potau, C. J. Petry, R. Jones, A. R. Ness, J. W. Honour, F. de Zegher, L. Ibanez, D. B. Dunger & A. S. Team (2004) Opposing influences of prenatal and postnatal weight gain on adrenarche in normal boys and girls. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89, 2647-2651.
- Ortlepp, J. R., J. Metrikat, M. Albrecht, A. von Korff, P. Hanrath & R. Hoffmann (2003) The vitamin D receptor gene variant and physical activity predicts fasting glucose levels in healthy young men. *Diabetic Medicine*, 20, 451-454.
- Palomer, X., J. M. Gonzalez-Clemente, F. Blanco-Vaca & D. Mauricio (2008) Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obesity & Metabolism*, 10, 185-197.
- Panierakis, C., G. Goulielmos, D. Mamoulakis, E. Petraki, E. Papavasiliou & E. Galanakis (2009) Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Crete, Greece. *Clinical Immunology*, 133, 276-281.
- Peters, B. S. E., L. C. dos Santos, M. Fisberg, R. J. Wood & L. A. Martini (2009) Prevalence of Vitamin D Insufficiency in Brazilian Adolescents. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 54, 15-21.
- Petry, C. J., K. K. Ong, D. L. Wingate, F. de Zegher, L. Ibáñez & D. B. Dunger (2007) Lack of association between common polymorphisms in the 17[beta]-hydroxysteroid

- dehydrogenase type V gene (HSD17B5) and precocious pubarche. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 105, 176-180.
- Pike, J. W. & M. B. Meyer (2010) The Vitamin D Receptor: New Paradigms for the Regulation of Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D-3. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 39, 255-269.
- Pittas, A. G. & B. Dawson-Hughes (2010) Vitamin D and diabetes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 121, 425-429.
- Pittas, A. G., J. Lau, F. B. Hu & B. Dawson-Hughes (2007) Review: The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92, 2017-2029.
- Poulin, R., D. Baker, D. Poirier & F. Labrie (1989) Androgen and glucocorticoid receptor-mediated inhibition of cell-proliferation by medroxyprogesterone acetate in zr-75-1 human-breast cancer-cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 13, 161-172.
- Qin, K., D. A. Ehrmann, N. Cox, S. Refetoff & R. L. Rosenfield (2006) Identification of a functional polymorphism of the human type 5 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene associated with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91, 270-276.
- Qin, K., M. I. New & K. C. Cheng. (1993) Molecular-cloning of multiple cdnas encoding human enzymes structurally related to 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 46, 673-679.
- Qin, K. & R. L. Rosenfield (2005) Characterization of the basal promoter element of the human type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Biochimica Et Biophysica Acta-Genes Structure and Expression*, 1728, 115-125.
- Querales, M. I., M. E. Cruces, S. Rojas & L. Sanchez (2010) Association between vitamin D deficiency and metabolic syndrome. *Revista Medica De Chile*, 138, 1312-1318.
- Ranjazad, F., A. Mahban, A. I. Shemirani, T. Mahmoudi, M. Vahedi, A. Nikzamir & M. R. Zali (2011) Influence of gene variants related to calcium homeostasis on biochemical parameters of women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28, 225-232.
- Reinchr, T., G. de Sousa, U. Alexy, M. Kersting & W. Andler (2007) Vitamin D status and parathyroid hormone in obese children before and after weight loss. *European Journal of Endocrinology*, 157, 225-232.
- Reis, J. P., D. von Muhlen, E. R. Miller, E. D. Michos & L. J. Appel (2009) Vitamin D Status and Cardiometabolic Risk Factors in the United States Adolescent Population. *Pediatrics*, 124, 371-379.
- Rosenfield, R. L., R. B. Lipton & M. L. Drum (2009) Thelarche, Pubarche, and Menarche Attainment in Children With Normal and Elevated Body Mass Index. *Pediatrics*, 123, 84-88.
- Sergeev, I. N. & W. B. Rhoten (1995) 1,25-dihydroxyvitamin d-3 evokes oscillations of intracellular calcium in a pancreatic beta-cell line. *Endocrinology*, 136, 2852-2861.
- Song, Y. & J. E. Manson (2010) Vitamin D, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes. *Current Cardiovascular Risk Report*, 4, 40-47.
- Steckelbroeck, S., M. Watzka, B. Stoffel-Wagner, V. H. J. Hans, L. Redel, H. Clusmann, C. E. Elger, F. Bidlingmaier & D. Klingmuller (2001) Expression of the 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 mRNA in the human brain. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 171, 165-168.
- Takiishi, T., C. Gysemans, R. Bouillon & C. Mathieu (2010) Vitamin D and Diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 39, 419-+.
- Teixeira, R. J., D. Ginzburg, J. R. Freitas, G. Fucks, C. M. Silva & M. A. N. Bordallo (2004) Serum leptin levels in premature Pubarche and prepubertal girls with and without obesity. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 17, 1393-1398.
- Tseng, L., A. Stolee & E. Gurbide (1972) Quantitative studies on uptake and metabolism of estrogens and progesterone by human endometrium. *Endocrinology*, 90, 390-&.
- Tzotzas, T., F. G. Papadopoulou, K. Tziomalos, S. Karras, K. Gastaris, P. Perros & G. E. Krassas (2010) Rising Serum 25-Hydroxy-Vitamin D Levels after Weight Loss in

- Obese Women Correlate with Improvement in Insulin Resistance. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95, 4251-4257.
- Utriainen, P., R. Voutilainen & J. Jaaskelainen (2009) Girls with Premature Adrenarche Have Accelerated Early Childhood Growth. *Journal of Pediatrics*, 154, 882-887.
- Valdivielso, J. M. & E. Fernandez (2006) Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clinica Chimica Acta*, 371, 1-12.
- Vuguin, P., B. Linder, R. G. Rosenfeld, P. Saenger & J. DiMartino-Nardi (1999) The Roles of Insulin Sensitivity, Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I), and IGF-Binding Protein-1 and -3 in the Hyperandrogenism of African-American and Caribbean Hispanic Girls with Premature Adrenarche. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 84, 2037-2042.
- Vupputuri, M. R., R. Goswami, N. Gupta, D. Ray, N. Tandon & N. Kumar (2006) Prevalence and functional significance of 25-hydroxyvitamin D deficiency and vitamin D receptor gene polymorphisms in Asian Indians. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 1411-1419.
- Wehr, E., S. Pilz, N. Schweighofer, A. Giuliani, D. Kopera, T. R. Pieber & B. Obermayer-Pietsch (2009) Association of hypovitaminosis D with metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome. *European Journal of Endocrinology*, 161, 575-582.
- Weinstei, G. D., P. Frost & S. L. Hsia (1968) In vitro interconversion of estrone and 17beta-estradiol in human skin and vaginal mucosa. *Journal of Investigative Dermatology*, 51, 4-10.
- Witchel, S. F. (2006) Puberty and polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 254, 146-153.
- Yildizhan, R., M. Kurdoglu, E. Adali, A. Kulusari, B. Yildizhan, H. G. Sahin & M. Kamaci (2009) Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in obese and non-obese women with polycystic ovary syndrome. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 280, 559-563.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>

## 9. ANEXOS

ANEXO 1:

**PROTOCOLO DE PUBARCA PRECOCE**  
**Unidade de Endocrinologia Ginecológica/Serviço de Endocrinologia/HCPA**

( ) grupo pubarca ( ) grupo controle

**Identificação**

Nome: _____	Idade: _____	Prontuário _____
Cor: _____	DN: _____	Data 1ª consulta: _____
Endereço: _____		
Telefones: _____		
Encaminhada por: _____		

**Pubarca:** \_\_\_\_\_ anos **Telarca:** \_\_\_\_\_ anos **Menarca:** \_\_\_\_\_ anos  
**Ciclos menstruais** (regularidade) \_\_\_\_\_ DUM 1 \_\_\_\_\_ DUM 2 \_\_\_\_\_  
**Hirsutismo:** ( ) sim ( ) não Surgimento \_\_\_\_\_ anos  
**Acne:** ( ) sim ( ) não Surgimento \_\_\_\_\_ anos  
**Seborréia/oleosidade** ( ) sim ( ) não Surgimento \_\_\_\_\_ anos  
**Alopecia** ( ) sim ( ) não Surgimento \_\_\_\_\_ anos  
**OBS:** \_\_\_\_\_

**Dados perinatais:**

Paridade da mãe \_\_\_\_\_ ordenação do filho \_\_\_\_\_  
 Pré-natal ( ) sim ( ) não Doenças crônicas da mãe \_\_\_\_\_  
 Parto: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_ Comp: \_\_\_\_\_ IG \_\_\_\_\_  
 Complicações na gestação \_\_\_\_\_ Uso de meds na gestação \_\_\_\_\_  
 Tabagismo ( ) sim ( ) não Etilismo ( ) sim ( ) não  
 Amamentação \_\_\_\_\_ meses Uso de meds na amamentação \_\_\_\_\_  
**OBS:** \_\_\_\_\_

**Infância:**

Doenças na infância: \_\_\_\_\_  
 Meds na Infância: \_\_\_\_\_  
 Ganho excessivo de peso ( ) sim ( ) não A partir de quando: \_\_\_\_\_  
 Desenvolvimento neuropsicomotor \_\_\_\_\_  
**OBS:** \_\_\_\_\_

**Dados atuais:**

Doenças ( ) sim ( ) não Quais \_\_\_\_\_  
 Uso de medicamentos ( ) sim ( ) não Quais \_\_\_\_\_

Uso de creme ( ) sim ( ) não

Qual \_\_\_\_\_

Cefaléia ( ) sim ( ) não

Alt Visuais ( ) sim ( ) não

Dor Abdominal ( ) sim ( ) não

Outras queixas \_\_\_\_\_

### História Familiar:

Menarca da mãe: \_\_\_\_\_ Irmãs: \_\_\_\_\_ Avós: \_\_\_\_\_

Doenças da mãe: \_\_\_\_\_

Doenças do pai: \_\_\_\_\_

Doenças em familiares (quem): \_\_\_\_\_

Puberdade, pubarca precoce: \_\_\_\_\_ PCOS: \_\_\_\_\_

Hirsutismo \_\_\_\_\_ Infertilidade \_\_\_\_\_

Distúrbios hormonais quaisquer \_\_\_\_\_

Diabetes \_\_\_\_\_

Dislipidemia \_\_\_\_\_ HAS \_\_\_\_\_

Obesidade \_\_\_\_\_ Cardiopatias \_\_\_\_\_

Altura da mãe: \_\_\_\_\_ Altura do pai: \_\_\_\_\_ Altura alvo (am+ap-13/2): \_\_\_\_\_

Peso da mãe \_\_\_\_\_ Peso do pai: \_\_\_\_\_

### Exame físico do diagnóstico// e da entrada no estudo (data \_\_\_\_\_ // \_\_\_\_\_):

Peso: \_\_\_\_//\_\_\_\_ Altura \_\_\_\_//\_\_\_\_ IMC \_\_\_\_//\_\_\_\_ Pressão 1 \_\_\_\_/\_\_\_\_ Pressão 2 \_\_\_\_//\_\_\_\_

Cintura: \_\_\_\_//\_\_\_\_ Quadril \_\_\_\_//\_\_\_\_

Mamas: \_\_\_\_//\_\_\_\_ Pêlos: \_\_\_\_//\_\_\_\_

Genitália (clitoriomegalia?) \_\_\_\_\_

Ferriman: M: \_\_LS: \_\_T: \_\_B \_\_AB \_\_ABS: \_\_ABI: \_\_D: \_\_RL: \_\_C: \_\_P \_\_TOTAL \_\_mod \_\_\_\_\_

Ferriman: M: \_\_LS: \_\_T: \_\_B \_\_AB \_\_ABS: \_\_ABI: \_\_D: \_\_RL: \_\_C: \_\_P \_\_TOTAL \_\_mod \_\_\_\_\_

Acne: \_\_\_\_//\_\_\_\_ Alopecia \_\_\_\_//\_\_\_\_

Seborréia/oleosidade \_\_\_\_\_//\_\_\_\_\_

Tireóide \_\_\_\_//\_\_\_\_ Acantose nigricans \_\_\_\_\_//\_\_\_\_\_

ACV \_\_\_\_//\_\_\_\_ AR \_\_\_\_\_//\_\_\_\_\_

AB \_\_\_\_//\_\_\_\_ EXT \_\_\_\_\_//\_\_\_\_\_

Manchas café com leite ( ) sim ( ) não

### Fluxograma de exames:

Exame	Do diagnóstico	2 <sup>a</sup> data:	3 <sup>a</sup> data:	4 <sup>a</sup> data:	5 <sup>a</sup> data:
LH					
FSH					
E2					
SHBG					
S-DHEA					
TestosteronaT					
17OHP					
A=0					
TSH					
T4 total					
PRL					
GH					
IGF1					
Glicose					
CT					
HDL					
LDL					
Trig.					
leptina					
adiponectina					
Prot C reativa					
IL-6					
Fibrinogênio					

Hemograma					
TGO /TGP					
creatinina					

**Teste ACTH: (após 0,25mg de ACTH intramuscular) data =**

17OHP(ng/ml)	0'	30'	60'
Cortisol (mcg/dl)	0'	30'	60'

Teste do LHRH	Basal / data=	2 <sup>oa</sup> / data =	3 <sup>o</sup> / data =
	0' / 30' / 60'	0' / 30' / 60'	0' / 30' / 60'
LH			
FSH			
LH/FSH			

**Teste de tolerância a glicose (TTG) após 75g de glicose: data =**

	Basal data =	2 <sup>oa</sup> / data =	3 <sup>o</sup> / data =	4 <sup>o</sup> / data=
	0' / 120'	0' / 120'	0' / 120'	0' / 120'
Glicemia				
Insulina				

**Coleta do DNA : data da coleta:**

**Ecografia**

	Basal data=	12 meses data =	24 meses data =
Útero			
OD			
OE			
Endométrio			
Corpo/colo			

**OBS:**

**Raio X de mãos e punhos para IO**

	Basal data=	12 meses data =	24 meses data =
Idade cronológica:			
Idade óssea:			
Desvio-padrão:			
Diferença:			

**Ecocardiografia:**

	Basal data=	2 <sup>a</sup> data =	3 <sup>a</sup> data =
FE VE (%)			
Ø diastólico VE			
Ø sistólico VE			
F. encurt. circunferenc			
Septo interventricular			
Parede posterior VE			
Massa VE (g/m <sup>2</sup> )			
Dimensão AE			
Aorta			
Vel máx. fluxo mitral no início diástole (E)			
Vel máx. fluxo mitral no final da diástole (A)			
E/A			

**OBS:**

## ANEXO 2

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
(Pacientes com Pubarca Precoce Isolada)**

**Termo de consentimento para participação no estudo sobre alterações no exames laboratoriais, na ecocardiografia e nos genes relacionados com a pubarca precoce.**

O ambulatório da Unidade de Endocrinologia Ginecológica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre está pesquisando a evolução clínica das meninas que apresentam o surgimento de pêlos pubianos antes dos 8 anos de idade, que se chama pubarca precoce. Nosso objetivo é observar a evolução dessas meninas, pois há uma predisposição ao desenvolvimento de Síndrome dos Ovários Policísticos que é caracterizada por alterações nos ciclos menstruais, ausência de ovulação, excesso de pêlos no corpo, maior chance de obesidade, problemas na glicose e no perfil de gorduras do sangue o que, no futuro, pode levar a problemas cardíacos. Para uma melhor avaliação, essas meninas serão comparadas com outras que não apresentam problemas relacionados com a puberdade.

Estamos convidando sua filha a participar deste estudo. Nesta pesquisa todas as meninas incluídas serão avaliadas através de entrevista e exame físico; coletarão sangue para exames laboratoriais no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. No caso da sua filha a maioria desses exames faz parte da avaliação de rotina. Neste estudo estamos propondo também uma avaliação cardiológica, através de ecocardiografia, com o objetivo de identificar mais cedo possíveis alterações cardíacas relacionados à pubarca precoce, o que poderá ter um possível benefício para sua filha. A ecocardiografia será feita no Instituto de Cardiologia de Porto Alegre e a paciente e um acompanhante receberão ajuda de custo para as passagens. Além disso, uma pequena fração da amostra de sangue coletada será armazenada e utilizada em outra pesquisa, que estudará os genes que estão envolvidos com a causa dessas alterações. O armazenamento terá tempo máximo previsto de 5 anos e você será contatado cada vez que o sangue for utilizado para um outro estudo não explicado nesse termo de consentimento podendo concordar ou não, bem como se houver algum resultado alterado que seja do seu interesse. Para isso é importante avisar aos pesquisadores abaixo, mudanças no seu telefone ou endereço. A identificação da amostra de sangue será feita através de um código para preservar o nome da paciente. Não há riscos adicionais ao de uma coleta de sangue habitual (que é a possibilidade de provocar uma mancha roxa e mínima dor local), nem risco do material genético ser utilizado para outros fins. A ecocardiografia não causa dor. Após a coleta dos dados para estudo, as pacientes seguirão o acompanhamento de rotina de acordo com o seu caso, podendo entrar em contato com a equipe sempre que julgar necessário através dos telefones abaixo.

As informações obtidas durante este estudo serão guardadas e poderão ser utilizadas em análises futuras bem como em publicações científicas. O nome das pacientes não será identificado em nenhuma publicação ou apresentação dos resultados desse estudo. Você e sua filha poderão desistir do estudo em qualquer momento ou por qualquer razão, sem que a paciente deixe de ser atendida no ambulatório. Caso tenha dúvidas ou perguntas fique à vontade para fazê-las antes de decidir se aceita participar do nosso estudo.

Declaro que estou ciente do que está escrito acima e concordo em participar do estudo. Marque com um x em quais etapas você concorda em participar:

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> entrevista e exame físico | <input type="checkbox"/> ecocardiografia no Instituto de Cardiologia |
| <input type="checkbox"/> coleta de sangue          | <input type="checkbox"/> armazenamento de sangue                     |

---

Nome e assinatura do Responsável

---

Nome e assinatura da Paciente

Data:

Pesquisadores responsáveis:

Dra. Fabíola Satler – telefone: 91229125

Dra. Poli Mara Spritzer – telefone: 33598246/ 33598271

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
(Pacientes do grupo controle)**

**Termo de consentimento para participação no estudo sobre alterações nos exames laboratoriais, na ecocardiografia e nos genes relacionados com a pubarca precoce**

O ambulatório da Unidade de Endocrinologia Ginecológica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre está pesquisando a evolução clínica das meninas que apresentam o surgimento de pêlos pubianos antes dos 8 anos de idade, que se chama pubarca precoce. Nosso objetivo é observar a evolução dessas meninas, pois há uma predisposição ao desenvolvimento de Síndrome dos Ovários Policísticos que é caracterizada por alterações nos ciclos menstruais, ausência de ovulação, excesso de pêlos no corpo, maior chance de obesidade, problemas na glicose e no perfil de gorduras do sangue o que, no futuro, pode levar a problemas cardíacos. Para uma melhor avaliação, essas meninas serão comparadas com outras que não apresentam problemas relacionados com a puberdade e é por isso que sua filha está sendo convidada a participar desse estudo, por não apresentar pubarca precoce.

Nesta pesquisa todas as meninas incluídas serão avaliadas através de entrevista, exame físico e ecocardiografia no Instituto de Cardiologia de Porto Alegre. A coleta de sangue para exames laboratoriais será feita no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sendo que a paciente e um acompanhante receberão ajuda de custo para as passagens. Além disso, uma pequena fração da amostra de sangue coletada será armazenada e utilizada em outra pesquisa, que estudará os genes que estão envolvidos com a causa da pubarca precoce. O armazenamento terá tempo máximo previsto de 5 anos e você será contatado cada vez que o sangue for utilizado para um outro estudo não explicado nesse termo de consentimento, podendo concordar ou não, bem como se houver algum resultado alterado que seja do seu interesse. Para isso é importante avisar aos pesquisadores abaixo, mudanças no seu telefone ou endereço. A identificação da amostra de sangue será feita através de um código para preservar o nome da paciente. Não há riscos adicionais ao de uma coleta de sangue habitual (que é a possibilidade de provocar uma mancha roxa e mínima dor local), nem risco do material genético ser utilizado para outros fins. A ecocardiografia não causa dor. Após a coleta dos dados para estudo, as participantes manterão o acompanhamento conforme o ambulatório de cardiologia e receberão o resultado dos exames coletados para a pesquisa. Se sua filha apresentar algum exame alterado não relacionado ao sistema cardiológico, você será orientada e encaminhada para atendimento pelo Sistema Único de Saúde. Portanto, a participação neste estudo poderá beneficiar a paciente no sentido de diagnosticar ou prevenir algum problema de saúde.

As informações obtidas durante este estudo serão guardadas e poderão ser utilizadas em análises futuras bem como em publicações científicas. O nome das pacientes não será identificado em nenhuma publicação ou apresentação dos resultados desse estudo. Você e sua filha poderão desistir do estudo em qualquer momento ou por qualquer razão, sem que a participante deixe de ser atendida no ambulatório de cardiologia. Caso tenha dúvidas ou perguntas fique à vontade para fazê-las antes de decidir se aceita participar do nosso estudo.

Declaro que estou ciente do que está escrito acima e concordo em participar do estudo. Marque com um x em quais etapas você concorda em participar:

- entrevista e exame físico       coleta de sangue no Hospital de Clínicas  
 ecocardiografia                       armazenamento de sangue

---

Nome e assinatura do Responsável

---

Nome e assinatura da Paciente

Data:

Pesquisadores responsáveis:

Dra. Fabíola Satler – telefone: 91229125

Dra. Poli Mara Spritzer – telefone: 33598246/ 33598271

## ANEXO 3

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu, \_\_\_\_\_ responsável pelo menor \_\_\_\_\_, autorizo sua participação no projeto de pesquisa intitulado “O IMPACTO DO TAMANHO GESTACIONAL E DO NÍVEL DE ATIVIDADE FÍSICA NA APTIDÃO FÍSICA E FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES” conduzida pela Dra Margaret C. da Silva Boguszewski, Professora Adjunta do Departamento de Pediatria da Universidade Federal do Paraná e pelo Professor Luis Paulo G. Mascarenhas. O estudo tem como objetivo avaliar se o tamanho que a criança tinha quando nasceu e se a quantidade de exercícios físicos e qualidade da sua alimentação atualmente tem influência na predisposição a fatores de risco para doenças do coração. Além disso, vamos avaliar o peso atual, a altura, a quantidade de gordura e a qualidade aeróbica nas crianças e adolescentes.

A participação de meu filho(a) é voluntária e estou ciente que não serei remunerado, podendo desistir em qualquer fase, isento de qualquer custo. Sei que a pesquisa envolverá a realização de exames de sangue (colesterol, triglicerídeos, HDL, LDL, glicemia, insulina e dosagem hormonal, polimorfismos genéticos nas meninas) que será realizado por enfermeiras capacitadas e utilização de material descartável nas coletas, avaliações de peso e altura, auto-avaliação do estágio de desenvolvimento da puberdade por comparação com imagem, avaliação de aptidão cardiorespiratória pelo teste de 20 metros e preenchimento de um questionário relacionado ao estilo de vida, comportamento alimentar e histórico médico familiar. Toda esta avaliação será realizada na própria escola, aplicada por pesquisadores treinados. Compreendo que a participação na pesquisa auxiliará no conhecimento sobre os benefícios do tamanho ao nascimento e o nível de atividade física sobre os fatores de risco de doenças em crianças e adolescentes e que os resultados do estudo podem ser publicados sem tornar pública a identidade do participante.

Fui informado que este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Qualquer dúvida sobre o estudo pode ser esclarecida pelo responsável: Prof(a) Dra Margaret C. da Silva Boguszewski – telefone (41) 3262-3837 e pelo Prof. Luis Paulo G. Mascarenhas – celular (41) 9122-1394.

Informamos ainda que todos os adolescentes, participantes do presente estudo, que apresentarem alterações no exame sanguíneo ou outros fatores de risco a sua saúde serão comunicados e orientados pessoalmente a entrarem em contato com o posto de saúde mais próximo de sua casa para agendar consulta médica.

Diante das colocações acima mencionadas concedo a participação voluntária do meu filho (a) na pesquisa e declaro que estou ciente dos objetivos e procedimentos e sei que posso retirar meu consentimento a qualquer instante.

Curitiba, \_\_\_\_/\_\_\_\_/200\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome do participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Nome do responsável Legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável

\_\_\_\_\_  
Pesquisador que aplicou TCLE

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável do projeto