**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA**

MARIANA TERESA ALVES SARTI DE PAULA

**Estudo da expressão do IGF1R mRNA em meninas com puberdade
precoce central antes e durante o tratamento com
análogos do GnRH**

**RIBEIRÃO PRETO-SP
2015**

MARIANA TERESA ALVES SARTI DE PAULA

**Estudo da expressão do IGF1R mRNA em meninas com puberdade
precoce central antes e durante o tratamento com
análogos do GnRH**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutora em Ciências.**

**Área de Concentração: Saúde da Criança e do
Adolescente**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Martinelli Jr.

Versão corrigida

**A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que
aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP
(BDTD).**

**RIBEIRÃO PRETO-SP
2015**

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

Catálogo da Publicação

Serviço de Documentação Médica

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

FICHA CATALOGráfICA

De Paula, M.T.A.S.

Estudo da expressão do IGF1R mRNA em meninas com puberdade precoce central antes e durante o tratamento com análogos do GnRH./ Mariana Teresa Alves Sarti de Paula ; orientador: Carlos Eduardo Martinelli Jr. – Ribeirão Preto, 2015

89 f. : il. 30 cm

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2015

1. Puberdade Precoce. 2. Crescimento. 3. IGF-I. 4. Receptor.
5. IGFBP

Nome: Mariana Teresa Alves Sarti de Paula

Título: Estudo da expressão do IGF1R mRNA em meninas com puberdade precoce central antes e durante o tratamento com análogos do GnRH.

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À Deus. Meus pais sempre me ensinaram a colocar Ele acima de todas as coisas, e neste momento não poderia fazer diferente.

Aos meus pais, meu eterno porto seguro.

Ao meu pai, Wagner, um exemplo de responsabilidade, dedicação e comprometimento com o trabalho e com a família.

À minha mãe Regina, minha grande amiga, conselheira, exemplo de mãe, esposa e mais recentemente a melhor avó que minha filha poderia ter. A pessoa que soube de uma maneira incrível me dar asas para voar porém me dar muitos motivos para sempre voltar. Impossível imaginar a conclusão desse trabalho sem o seu auxílio diário.

Ao meu marido Thiago, meu grande companheiro. Compreende, admira e incentiva a minha dedicação ao trabalho de uma maneira muito especial. O seu companheirismo fez com que a caminhada até aqui fosse muito mais tranquila.

À minha filha, Julia, razão da minha vida. Há 3 anos ela chegou para completar minha felicidade junto com as pessoas citadas acima. Depois de ser mãe me tornei uma pessoa mais forte, uma filha melhor e uma pediatra muito mais compreensiva.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Martinelli Junior, agradeço não somente a orientação desse trabalho mas também a orientação no dia a dia da nossa profissão, os conselhos ora como orientador, ora como colega de profissão e muitas vezes como um verdadeiro pai.

Aos outros docentes da Endocrinologia Pediátrica da FMRP-USP: Prof. Dr. Sonir Antonini, muito me ensinou desde meu primeiro ano de residência, um exemplo de dedicação à vida profissional, acadêmica e de pesquisa, e Prof. Dr. Rafael Liberatore Junior pelos ensinamentos e sugestões para esse trabalho.

Aos médicos assistentes da Endocrinologia Pediátrica da FMRP-USP: Patrícia, Rodrigo e Soraya, pela convivência, amizade, compreensão, conversas tranquilizadoras, além das sugestões para esse trabalho.

Aos médicos residentes da Endocrinologia Pediátrica da FMRP-USP que cumpriram seus programas entre os anos de 2011 e 2015, cada um de uma maneira ou de outra colaborou na conclusão desse trabalho.

À Dra. Rafaela Ricco, pela importante ajuda para obter os indivíduos controles desse trabalho.

Aos Professores Doutores Ayrton Moreira, Ana Carolina Sá, Vinicius Brito e Ana Paula Montenegro pela atenção e disponibilidade a esta tese.

À Veridiana Kiill Suazo e Rosane Queiroz, pela ajuda nas dosagens laboratoriais realizadas no Laboratório de Pediatria-Biologia Molecular do HC-FMRP-USP.

À Lucimara Bueno, Helen Alves de Oliveira e José Roberto da Silva,
pelo auxílio nas dosagens laboratoriais realizadas no Laboratório de
Endocrinologia e Metabologia do HC-FMRP-USP.

Às secretárias do Departamento de Puericultura e Pediatria, Vera,
Dulcides, Sandra e Fernanda pela amizade e colaboração.

Às crianças que participaram do estudo e suas famílias pela
compreensão e confiança.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

RESUMO

De Paula, M.T.A.S. **Estudo da expressão do IGF1R mRNA em meninas com puberdade precoce central antes e durante o tratamento com análogos do GnRH.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

INTRODUÇÃO Na puberdade, tanto fisiológica quanto precoce, um dos eventos marcantes é o estirão de crescimento. Análogos do GnRH tem sido utilizado como tratamento da puberdade precoce central (PPC) tendo como consequência o bloqueio do eixo gonadal e diminuição da velocidade de crescimento, porém mantém níveis séricos elevados de IGF-I e IGFBP-3. Não existem relatos sobre a expressão do IGF1R durante a puberdade. Considerando-se que este poderia ser um ponto de regulação da velocidade de crescimento, o presente estudo propõe avaliar a expressão do IGF1R em meninas com PPC antes e durante o tratamento. **MÉTODOS:** Avaliamos meninas com PPC que foram divididas em dois grupos: Grupo A foi constituído por 16 meninas avaliadas antes do início do tratamento com idade média de 8,0+-0,7anos e o Grupo B constituído por 16 pacientes em uso regular do análogo do GnRH com idade média de 9,4+-0,8 anos. O grupo controle foi composto por 18 crianças saudáveis, pré-púberes com idade média 7,1+-1,3 anos. **RESULTADOS:** A expressão do mRNA do gene do IGF1R foi maior no grupo B (2,41; 1,21-12,41) quando comparado ao grupo A (1,32; 1,02-12,41) ($p=0,04$) e ao grupo controle(1,15; 0,70-1,72) ($p=0,004$). Não foi observada diferença estatística entre o Grupo A e o grupo controle ($p=0,17$). Os níveis séricos de IGF-I e IGFBP3 foram significativamente maiores no grupo A (IGF-I: 394,5; 321,3-457,8 IGFBP3: 4,87; 4,27-5,88) em relação ao grupo controle(IGF-I:143,5; 122-190,8 IGFBP3: 3,93; 3,10-4,26)($p<0,0001$). Não encontramos diferença nas concentrações de IGF-I ou IGFBP3 entre os grupos A e B (IGF-I:417,5; 368,3-520,3 IGFBP3: 5,58; 4,76-6,09). O grupo controle apresentou níveis mais elevados de IGFBP1 (38,4; 24,7-64,1) quando comparado com os grupos A (7,00; 3,84-15,07) e B (2,61; 1,70-6,79) ($p<0,001$). Ao compararmos somente os grupos A e B, o grupo B apresentou número estatisticamente maior de valores indetectáveis de IGFBP1 (11/15) quando comparado com o grupo A (8/16) ($p=0,01$) mostrando uma tendência a valores menores no grupo B. A dosagem de insulina foi significativamente menor no grupo controle (3,6; 2,5-5,6) quando comparado ao grupo A (8,3; 5-13,5) ($p<0,001$) e não apresentou diferença entre os grupos A e B(7,00; 4,5-10,5) . Ao analisarmos os 3 grupos (controle, A e B) não encontramos a correlação negativa entre insulina e IGFBP-1. Essa correlação aparece quando avaliamos somente o grupo controle e o grupo A ($r= -0,5$; $p=0,007$) e desaparece quando acrescentamos o grupo B na análise. **CONCLUSÃO:** As variações nas concentrações séricas de IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-1 e insulina não explicam a desaceleração da velocidade de crescimento durante o tratamento de meninas com puberdade precoce central com análogos do GnRH. O aumento da expressão do IGF1R parece refletir uma redução da sinalização intracelular do IGF1R com consequente diminuição da bioatividade do IGF-I em um mecanismo de feedback de alça ultra curta. O aumento da secreção do hormônio de crescimento devido a redução do feedback negativo na hipófise, explica as concentrações encontradas de IGF-I, IGFBP3 e IGFBP1. Estudos outros serão

necessários para confirmar esta hipótese, avaliando diferentes pontos de sinalização na cascata pós-receptor.

ABSTRACT

BACKGROUND: Growth spurt is a major event in central precocious puberty (CPP). GnRH analogues (GnRHa) treatment inhibit gonadal axis and decrease height velocity. However, serum IGF-I and IGFBP-3 remain high as before treatment. No reports regarding IGF type 1 receptor (IGF1R) in CPP is available. Considering that this could be a point of regulation of height velocity, the present study aims to study IGF1R mRNA expression in girls with CPP before and during GnRHa treatment.

METHODS: Sixteen girls with CPP (8.0 ± 0.7 yr) were evaluated before treatment (Group A) and sixteen (9.4 ± 0.8 yr) in use of GnRHa (Group B). Age-matched pre pubertal children were studied as controls ($n=18$). Fasting blood sample were collect for IGF1R mRNA expression analysis in peripheral lymphocytes (RT-PCR) and serum IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-1 and insulin determination.

RESULTS: The expression of IGF1R mRNA was higher in Group B(2,41; 1,21-12,41) than in Group A(1,32; 1,02-12,41) ($p=0.04$) and Controls(1,15; 0,70-1,72) ($p=0.004$). No difference was observed between Groups A and Controls. IGF-I and IGFBP-3 were similar in Group A(IGF-I: 394,5; 321,3-457,8 IGFBP3: 4,87; 4,27-5,88) and B (IGF-I:417,5; 368,3-520,3 IGFBP3: 5,58; 4,76-6,09) but higher than in Controls (IGF-I:143,5; 122-190,8 IGFBP3: 3,93; 3,10-4,26) ($p<0.0001$). IGFBP-1 was higher ($p<0.0001$) in Controls (38,4; 24,7-64,1) than in Groups A (7,00; 3,84-15,07) and B (2,61; 1,70-6,79). When we compare only Groups A and B, group B showed more IGFBP1 undetectable values (11/15) than group A (8/16)($p = 0.01$) showing a tendency to lower values in group B. Insulin levels were lower in Controls(3,6; 2,5-5,6) than in Group A(8,3; 5-13,5) ($p<0,001$) , but no difference were observed between Groups B (7,00; 4,5-10,5) and A. Negative correlation was found between insulin and IGFBP-1 when controls and Group A were put together ($r= -0.5$; $p=0.007$). This correlation disappears if Group B is included in the analysis.

CONCLUSION: Serum concentrations of IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-1 and insulin do not explain the decrease in height velocity during CPP treatment with GnRH analogue. The increase in IGF1R mRNA expression suggest impairment of IGF-I signaling and compensatory up regulation of the IGF1R. Increased GH concentrations due to reduction of IGF-I feedback could explain the IGF-I, IGFBP-3 and IGFBP-1 findings. Other studies are necessary to confirm this hypothesis by studying different signaling points in post-receptor cascade.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Expressão do mRNA do gene do IGF1R nos indivíduos controles (verde), pacientes do Grupo A (azul) e do Grupo B (vermelho). A barra contínua representa mediana e a linha tracejada representa o valor de 2 assumido como limite superior.	42
Figura 2: Concentrações séricas de IGF-I nos indivíduos indivíduos controles (verde), pacientes do Grupo A (azul) e do Grupo B (vermelho). A barra contínua representa mediana.	43
Figura 3: Valores do IGF-I ajustado para sexo e idade (valor – p50 / p50) nos indivíduos controles (verde), pacientes do Grupo A (azul) e do Grupo B (vermelho). A barra contínua representa mediana e a pontilhada o percentil 50.	44
Figura 4: Concentrações séricas de IGFBP-3 nos indivíduos controles (verde), pacientes do Grupo A (azul) e do Grupo B (vermelho). A barra contínua representa mediana.	45
Figura 5: Relação Molar entre concentrações de IGF-I e IGFBP-3 nos indivíduos controles (verde), pacientes do Grupo A (azul) e do Grupo B (vermelho). A barra contínua representa mediana.....	46
Figura 6: Concentrações séricas de IGFBP-1 nos indivíduos controles (verde), pacientes do Grupo A (azul) e do Grupo B (vermelho). A barra contínua representa mediana.	47
Figura 7: Concentrações séricas de IGFBP-1 nos indivíduos do Grupo A (azul) e do Grupo B (vermelho). A barra contínua representa mediana e a pontilhada a concentração de 5 ng/ml.	48
Figura 8: Concentrações séricas de Insulina nos indivíduos controles (verde), pacientes do Grupo A (azul) e do Grupo B (vermelho). A barra contínua representa mediana.	49
Figura 9: Correlação dos valores do IGF1R com a velocidade de crescimento, tempo de tratamento e IMC nas pacientes do grupo B.....	50
Figura 10: Expressão relativa do gene IGF1R ($2^{-\Delta\Delta CT}$) antes (Grupo A) e durante o tratamento (Grupo B) com análogos do GnRH nas 6 meninas seguidas prospectivamente.	52
Figura 11: Concentrações séricas o IGF-I antes (Grupo A) e durante o tratamento (Grupo B) com análogos do GnRH nas 6 meninas seguidas prospectivamente.	53
Figura 12: Concentrações séricas o IGFBP-3 antes (Grupo A) e durante o tratamento (Grupo B) com análogos do GnRH nas 6 meninas seguidas prospectivamente.	54

Figura 13: Relação molar entre IGF-I e IGFBP-3 antes (Grupo A) e durante o tratamento (Grupo B) com análogos do GnRH nas 6 meninas seguidas prospectivamente.	55
Figura 14: Escore de desvio padrão de estatura antes (Grupo A) e durante o tratamento (Grupo B) com análogos do GnRH nas 6 meninas seguidas prospectivamente.	56
Figura 15: Escore de desvio padrão do IMC antes (Grupo A) e durante o tratamento (Grupo B) com análogos do GnRH nas 6 meninas seguidas prospectivamente.	57
Figura 16: GnRHa provoca um bloqueio da sinalização do IGF1R com consequente diminuição da bioatividade do IGF-I, aumento da expressão do IGF1R, aumento da secreção do GH que leva ao aumento de IGF-I e IGFBP-3 e diminuição de IGFBP-1.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características clínicas; gênero, idade, velocidade de crescimento, tempo de tratamento (média e desvio padrão), Escore Z de estatura e IMC (mediana e intervalo interquartil), e características laboratoriais; LH basal, pico pós estímulo com GnRH endovenoso e 2h após aplicação do análogo do GnRH de depósito e característica radiológica da idade óssea (média e desvio padrão) de cada grupo.O símbolo * demonstra os dados que apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$).....	34
Tabela 2: Resumo dos principais resultados (média e intervalo interquartil) dos 3 grupos participantes do estudo.	51

LISTA DE SIGLAS

ALS –	subunidade ácido-lábil
DNTPs –	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EGF –	fator de crescimento epidérmico
ERK –	sinal extracelular relacionado à cinase
FSH -	hormônio folículo estimulante
GH –	hormônio de crescimento
GHRH –	hormônio hipotalâmico liberador do GH
GnRH –	hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofinas
IGF –	<i>insulin like growth fator</i> ou fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBPs –	proteínas ligadoras do IGF
IGF1R –	receptor tipo 1 do IGF
IR –	receptor de insulina
IRS-1 –	substrato do receptor de insulina 1
LH –	hormônio luteinizante
NSILA –	<i>nonsuppressible insulin-like activity</i> ou atividade semelhante à insulina não suprimível
PI3K –	fosfaditilinositol 3 cinase
PIP3 –	fosfatidilinositol 3 fosfato
PPC –	puberdade precoce central
PTH –	hormônio das paratireóides
SH2 –	Src homology 2
Shc –	proteína que contém SH2
Sos –	fator de troca da guanina <i>Son of Sevenless</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Puberdade Fisiológica	17
1.2 O Eixo GH-IGF	18
1.3 O Eixo GH-IGF na puberdade	23
1.4 Puberdade Precoce em meninas	24
1.5 Puberdade Precoce Central (PPC)	25
1.6 Eixo GH-IGF na PPC	25
1.7 Tratamento da PPC.....	26
1.8 O Eixo GH-IGF durante o tratamento da PPC.....	27
 2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo principal.....	29
2.2 Objetivos secundários	29
 3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	30
3.1 Tipo de estudo.....	31
3.2 Pacientes.....	31
3.3 Controles	31
3.4 Termo de Consentimento	32
3.5 Comitê de Ética	32
3.6 Desenho Experimental	32
3.7 Coleta de sangue	35
3.8 Dosagens laboratoriais.....	35
3.8.1 Imunoensaios	35
3.8.1.1 Imunoensaio do IGF-I.....	35
3.8.1.2 Imunoensaio da IGFBP-3	36
3.8.1.3 Imunoensaio da IGFBP-1	36
3.8.1.4 Imunoensaio da insulina	37
3.8.1.5 Imunoensaio de LH	37
3.8.2 Avaliação da expressão do IGF1R.....	37
3.9 Análise Estatística	38

4 RESULTADOS.....	40
4.1 RESULTADOS DO ESTUDO 1.....	41
4.1.1 IGF1R (mRNA).....	41
4.1.2 IGF-I	43
4.1.3 IGF-I ajustado (valor - p50 / p50)	44
4.1.4 IGFBP-3	45
4.1.5 Relação Molar IGF-I/IGFBP3	46
4.1.6 IGFBP-1	47
4.1.7 IGFBP-1 menor que 5 ng/ml (indetectável)	48
4.1.8 Insulina	49
4.1.9 Correlações.....	50
4.1.8 Resumo dos resultados (Tabela 2)	51
4.2 RESULTADOS DO ESTUDO 2.....	52
4.2.1 IGF1R (mRNA).....	52
4.2.2 IGF-I	53
4.2.3 IGFBP-3	54
4.2.4 Relação Molar IGF-I/IGFBP3	55
4.2.5 Escore de desvio padrão da estatura	56
4.2.6 Escore de desvio padrão do IMC	57
 5 DISCUSSÃO	 58
 6 CONCLUSÃO	 67
 7 REFERÊNCIAS.....	 69
 8 ANEXOS	 74
 9 ARTIGO	 82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Puberdade Fisiológica

A puberdade é o período de transição entre a infância e a idade adulta, durante o qual os caracteres sexuais secundários aparecem e o estirão puberal ocorre. O principal evento hormonal para o início da puberdade é o aumento da secreção do hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofinas (GnRH) o qual estimulará a produção do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH) pela hipófise, e estes a produção de esteróides sexuais e maturação dos gametas pelas gônadas(MACEDO et al., 2014). Há décadas já foi descrito em animais com lesão hipotalâmica, que a infusão contínua de GnRH não consegue reestabelecer a produção de gonadotrofinas pela hipófise enquanto a secreção oscilatória é capaz de retornar a produção adequada de gonadotrofinas pela hipófise. Sendo assim para que ocorra a puberdade fisiológica é necessário que se inicie uma produção de GnRH e essa produção deve ocorrer de maneira oscilatória(BELCHETZ et al., 1978).

Essa liberação pulsátil do GnRH ocorre inicialmente no período neonatal mas depois passa por um longo período de supressão até a puberdade, quando ocorre a reativação da liberação pulsátil de GnRH. Os mecanismos que desencadeiam o início da secreção pulsátil de GnRH e consequentemente o desenvolvimento puberal, ainda não são totalmente conhecidos. Estudos epidemiológicos indicam que um conjunto de fatores ambientais e metabólicos está envolvido na regulação do início puberal; entre eles nutrição, substâncias químicas do meio ambiente, assim como etnia e fatores genéticos (PARENT et al., 2003). Já foi demonstrada a importância da Kisspeptina e do seu receptor para que ocorra a secreção de GnRH, porém ainda há muitas questões a serem respondidas sobre o controle do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (KAISER; KUOHUNG, 2005). Alguns fatores genéticos também foram descritos recentemente e sua identificação tem extrema importância para melhor compreendermos a regulação neuro-endócrina do início da puberdade(BULCAO MACEDO; NAHIME BRITO; LATRONICO, 2014).

O início da puberdade é considerado fisiológico se ocorrer entre 8 e 13 anos nas meninas. A puberdade normal na maioria das meninas se inicia com o aparecimento do broto mamário (telarca) e após poucos meses ocorre o aparecimento dos pelos pubianos (pubarca). O exame físico do estadiamento puberal é descrito segundo os critérios de Tanner, o qual avalia os estágios da puberdade no qual o

estágio 1 de Tanner representa a criança pré púbere. Em relação ao desenvolvimento mamário o estágio 2 (M2) indica presença de glândula mamária palpável subareolar, no estágio 3 (M3) ocorre aumento e elevação da glândula mamária, no estágio 4 (M4) há projeção da aréola formando um monte secundário em relação ao restante da mama, e o estágio 5 (M5) corresponde a mama adulta. O estágio 2 dos pelos pubianos (P2) corresponde a pelos longos, lisos, localizados nos grandes lábios, no estágio 3 (P3) os pelos são mais grossos, escuros, encaracolados e confluem para o púbis, no estágio 4 (P4) o pelo tem característica de adulto mas ainda não há pelos na raiz das coxas, no estágio 5 (P5) os pelos cobrem todo o púbis formando um triângulo invertido e atinge a face interna das coxas. Outro marco da puberdade é o aumento da velocidade de crescimento que nas meninas ocorre principalmente durante os primeiros estágios puberais(MARSHALL; TANNER, 1969).

1.2 O Eixo GH-IGF

O aumento da velocidade de crescimento é um grande marco do período puberal. Os hormônios, particularmente os componentes do eixo GH-IGF (hormônio de crescimento – fator de crescimento semelhante à insulina ou insulin-like growth factor) constituem a via final responsável pelo processo de crescimento.

O GH é produzido pela hipófise anterior após estímulo hipotalâmico exercido pelo GHRH (hormônio hipotalâmico liberador do GH). Sua secreção ocorre em pulsos, principalmente, no período noturno. A ghrelina também estimula a produção de GH pela hipófise enquanto a Somatostatina exerce efeito inibitório. Diversos fatores como a tiroxina, o glucagon, os esteroides sexuais entre outros, também podem interferir na secreção de GH. Além disso, existe o sistema de retroalimentação negativa exercida pelo GH e pelos IGFs regulando as concentrações do GHRH, da somatostatina ou atuando diretamente nas células hipofisárias (MARTINELLI JR; CUSTÓDIO; AGUIAR-OLIVEIRA, 2008).

Salmon & Daughaday foram os primeiros a propor que as ações do hormônio de crescimento (GH) não seriam ações diretas. Eles formularam a hipótese de que o GH estimularia a produção de uma substância intermediária responsável pelo seu efeito biológico, denominada inicialmente de fator de sulfatação(SALMON;

DAUGHADAY, 1957). Ao mesmo tempo, um outro grupo de pesquisadores isolou uma fração de atividade semelhante a insulina não suprimível (NSILA). Foi verificado que esses fatores eram idênticos e então recebeu o nome de Somatomedina. Em 1976, Rinderknecht and Humbel sugeriram a modificação do nome para *insulin like growth factor* (IGF) devido ao fato de serem 2 hormônios (IGF-I e IGF-2) similares entre si e similares à insulina com importante ação sobre o crescimento celular e tecidual (RINDERKNECHT; HUMBEL, 1976).

Os IGFs (IGF-I e IGF-2) são moléculas compostas por uma sequência única de 70 e 67 aminoácidos com pesos moleculares de 7.650 e 7.479 dáltons, respectivamente.

Inicialmente acreditava-se que o GH atuava exclusivamente sobre o crescimento através do estímulo da produção hepática do IGF-I o qual agiria na placa epifisária provocando o crescimento ósseo (Teoria da Somatomedina). Posteriormente foi descoberta uma produção local de IGF-I em diversos tecidos, inclusive no tecido ósseo mostrando assim que o IGF-I também tem ações autócrinas e parácrinas. A real importância do IGF-I local versus sistêmico ainda é incerta, porém estudos que demonstram a resposta do tratamento com IGF-I em pacientes com disfunção do receptor de GH ou deleção do gene do IGF-I sugere claramente que sua ação endócrina tem um papel fundamental no crescimento humano (JUUL, 2003).

Os níveis circulantes de IGF-I apresentam uma boa correlação com a secreção de GH na vida pós-natal e a expressão hepática do IGF-I responde principalmente ao estímulo do GH.

O IGF-I extracelular está ligado, com uma alta afinidade, a uma família de 6 proteínas específicas chamadas proteínas ligadoras do IGF (IGFBPs) que são produzidas em diversos tecidos e encontradas em diferentes fluidos como o plasma. As IGFBPs possuem diferentes funções: transportam proteína no plasma e controlam a saída dos IGFs do espaço vascular, prolongam a meia vida dos IGFs e regulam sua metabolização, modulam a interação dos IGFs com seus respectivos receptores e, portanto indiretamente controlam as ações biológicas dos IGFs, além de apresentarem ações celulares diretas, funcionando como um ligante dos receptores (JONES; CLEMMONS, 1995).

Todas as 6 IGFBPs formam complexos binários com os IGFs porém a IGFBP3 forma um complexo ternário de alto peso molecular (150kd) composto pelo

IGF, IGFBP3 e uma subunidade proteica ácido-lábil (ALS) com peso molecular de aproximadamente 85KDa. Sendo assim o IGF encontra-se na circulação sob três formas: forma livre (7,5kd), complexo binário (40-50kd) e complexo ternário (150kd). Aproximadamente 95% do IGF circulante encontram-se sob a forma de complexo ternário. Devido seu alto peso molecular, esse complexo ternário não ultrapassa a barreira endotelial e, portanto, não está disponível nos tecidos. Os três componentes desse complexo (IGF/IGFBP3/ALS) são GH dependentes, sendo um mecanismo adicional da regulação do GH sobre o eixo IGF. Sua formação ocorre no fígado, sendo o IGF-I e a ALS produzidos pelos hepatócitos e a IGFBP3 produzida pelas células de Kupffer (JUUL, 2003).

A IGFBP1 se liga a uma pequena fração do IGF circulante, porém essa proteína tem sido muito estudada devido a sua rápida regulação e flutuação de acordo com os níveis de insulina. A produção hepática de IGFBP1 é inversamente proporcional ao aporte hepático de insulina. Acredita-se que a IGFBP-1 possa participar do controle da homeostase da glicose mediante rápidas modificações na biodisponibilidade do IGF-1, tendo uma correlação direta entre os níveis de glicemia pós-prandial e as concentrações de IGFBP-1 antes da ingestão alimentar.

A IGFBP2 se liga com maior afinidade ao IGF-2 do que ao IGF-I. É a segunda IGFBP mais abundante do plasma. A IGFBP-2 é capaz de transpor a barreira endotelial intacta e transportar IGFs para os tecidos vizinhos (função também é realizada pela IGFBP-1) mas diferentemente do que ocorre com a IGFBP-1, esta mobilização não é estimulada pela insulina.

A IGFBP3 é a IGFBP mais abundante na circulação e está ligada a maioria do IGF-I e IGF-2 circulante (85 A 90% dos IGFs circulantes). O principal local de produção da IGFBP-3 circulante é o fígado, embora também seja secretada em outros órgãos e tecidos do organismo. É GH dependente apresentando estreita correlação com a secreção de GH e IGF.

A IGFBP4 é uma proteína não glicosilada que se liga ao IGF-I e IGF-2 com igual afinidade. A regulação da sua concentração sérica parece ser controlada pelo hormônio das paratireoides (PTH) e ter envolvimento no turnover ósseo.

A IGFBP5 é uma proteína glicosilada com a maior afinidade pelos IGFs, sendo a IGFBP mais abundante no tecido ósseo. Parece estar envolvida no metabolismo ósseo assim como a IGFBP4. O GH é o seu principal regulador. Assim

como a IGFBP-3, a IGFBP-5 pode associar-se aos IGFs e à ALS formando o complexo ternário.

A IGFBP6 é uma proteína glicosilada que se liga com uma maior afinidade ao IGF-2 que ao IGF-I, o que determina que module principalmente as ações do IGF-2. A IGFBP-6 e a IGFBP-2 constituem as duas IGFBPs mais abundantes no liquor cefalorraquidiano.

O ALS é uma glicoproteína, membro de uma família de proteínas com repetição rica em leucina. Contém 578 aminoácidos dos quais aproximadamente 25% consiste em leucina. Essa proteína se liga a um domínio carboxi-terminal da IGFBP3 para formar o complexo ternário. Tem essa denominação (ácido-lábil) pelo fato de tornar-se irreversivelmente desnaturada quando submetida à acidificação do meio(JUUL, 2003; MARTINELLI JR; CUSTÓDIO; AGUIAR-OLIVEIRA, 2008).

Após a descoberta e identificação das moléculas dos IGFs, foram descobertos os seus respectivos receptores. No início de 1980, através de técnicas que avaliam afinidade por ligação cruzada, foi determinado o peso molecular dos receptores de insulina (IR), IGF-I (IGF1R) e do IGF-2(IGF2R), determinando ser três receptores distintos(JONES; CLEMMONS, 1995).

Tanto o IR quanto o do IGF1R são glicoproteínas da superfície celular com atividade tirosina-cinase, O IGF2R é estruturalmente diferente do IGF1R e do IR, sendo semelhante ao receptor da manose 6 fosfato e sem atividade tirosina-cinase(JUUL, 2003).

A maioria as ações tanto do IGF-I quanto do IGF-2 ocorrem mediante sua ligação com o receptor do IGF-I também chamado de receptor tipo 1 do IGF (IGF1R). O IGF1R é formado por 2 subunidades α extracelular e 2 subunidades β transmembrana ligadas entre si por pontes dissulfídicas formando um $\alpha_2\beta_2$ holoreceptor.. O IGF1R apresenta grande semelhança estrutural com o receptor de insulina sendo ambos formados por 2 subunidades α extracelular e 2 subunidades β transmembrana ligadas entre si por pontes dissulfídicas, porém as subunidades α de cada receptor contém ligantes específicos que tornam a afinidade do IGF1R 100 vezes maior pelo IGF-I e a afinidade do receptor de insulina 100 vezes maior pela insulina. Devido essa semelhança estrutural, as células que expressam genes de ambos os receptores podem apresentar receptores híbridos insulina/IGF. Esses receptores híbridos possuem uma maior afinidade pelo IGF(JONES; CLEMMONS, 1995). Resumindo o IR é ativado principalmente pela insulina tendo como resultado

dessa ativação ações metabólicas, enquanto o IGF1R é ativado principalmente pelos IGFs tendo como resultado dessa ativação ações de proliferação e diferenciação celular (SARFSTEIN; WERNER, 2013).

Após a ligação do IGF ao seu receptor as cadeias β desencadeiam a reação de fosforilação da tirosina iniciando uma cascata de sinalização. Um dos primeiros pontos dessa cascata é a fosforilação de uma proteína denominada substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1). A fosforilação do IRS-1 desencadeará duas cascatas de sinalização distintas. A primeira envolve a ativação da fosfatidilinositol 3 cinase (PI3k) com subsequente formação do fosfatidilinositol 3 fosfato (PIP3) que atua como um sinalizador para o crescimento celular. Também como resultado da fosforilação do IRS-1 ocorre a formação de um complexo do IRS-1 com a proteína ligada ao receptor de fator de crescimento (Grb2), fator de troca da guanina Son of Sevenless (Sos). A formação desse complexo parece ser essencial para ativação do Ras. A ativação do Ras tem como resultado final a fosforilação e ativação dos sinais extracelulares relacionados à cinase (ERKs). O Ras também pode ser ativado por uma cascata independente do IRS-1. Os receptores do IGF-1, da insulina, do fator de crescimento epidérmico (EGF) e do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) possuem um mecanismo semelhante de auto fosforilação que resulta na fosforilação tirosina da proteína que contém SH2 (Shc) que é capaz, independente do IRS-1, de formar um complexo com Grb2 e Sos que também ativa o Ras. Os estudos mostram que tanto a atividade tirosina cinase quanto a autofosforilação são essenciais para todas as ações mediadas pelo IGF1R (JONES; CLEMMONS, 1995). Todas essas vias de sinalização intracelular do IGF1R ativarão fatores de transcrição e consequentemente a expressão gênica de genes relacionados ao crescimento e diferenciação celular.

Recentemente tem sido demonstrado tanto o IGF1R quanto o IR têm a capacidade de transladarem-se do citoplasma para o núcleo celular e fazer o papel de um fator de transcrição (SARFSTEIN; WERNER, 2013).

1.3 O Eixo GH-IGF na puberdade

Como já descrito anteriormente, durante a puberdade ocorre o estirão de crescimento e sendo o eixo GH-IGF a via final responsável pelo crescimento, é esperado que esse eixo esteja mais ativado durante a puberdade.

Os esteróides sexuais são os principais moduladores do estirão puberal e da maturação da placa epifisária, sendo o estrógeno o principal modulador em ambos os sexos. O estrógeno possui ações tanto diretas na placa epifisária quanto indiretas através do estímulo da produção de GH (PERRY; FARQUHARSON; AHMED, 2008).

Através da avaliação de meninas saudáveis, já foi demonstrado que a secreção de GH aumenta significativamente do estágio pré-puberal até a menarca e diminui posteriormente. Ocorre aumento da secreção média de GH, da quantidade e amplitude dos pulsos de GH (WENNINK et al., 1991). Os níveis séricos de IGF-I e IGFBP3 também já foram estudados em crianças saudáveis. Os níveis de IGF-I apresentam um aumento discreto com a idade nas crianças pré-púberes, porém foi observado um aumento significativo durante a puberdade e uma queda posteriormente (JUUL et al., 1994). A IGFBP3 apresentou característica semelhante com níveis que aumentaram com a idade e atingiram o pico na puberdade. Porém, o aumento do IGF-I é relativamente maior que o aumento da IGFBP3 tendo como resultado o aumento da relação molar entre IGF-I/IGFBP3. Alguns autores sugerem que esse aumento da relação molar seria o responsável pelo estirão de crescimento na puberdade. Os níveis de IGF-2 E IGFBP2 não se modificam com o início da puberdade. Entretanto os níveis séricos da IGFBP1 diminuem com a idade apresentando os menores valores durante o desenvolvimento puberal (JUUL; DALGAARD; SKAKKEBAEK, 1995).

Não há estudos sobre a expressão do IGF1R mRNA durante a puberdade.

1.4 Puberdade Precoce em meninas

A puberdade precoce pode ser definida como a produção ou exposição aos esteroides sexuais antes da idade limite definida para cada sexo. A puberdade é definida como precoce, em meninas, se o início dos caracteres sexuais secundários ocorrer antes dos 8 anos de idade. Um estudo Norte Americano (PROS study) sugeriu uma diminuição dessa idade limite em 1997, porém estudos posteriores mostraram a possibilidade de não diagnosticar patologias endócrinas importantes caso fosse modificada a idade limite de início da puberdade (HERMAN-GIDDENS et al., 1997; MIDYETT; MOORE; JACOBSON, 2003). Essa tema já foi amplamente discutido na literatura porém os guidelines continuam considerando como limite 8 anos de idade (CAREL et al., 2009).

A causa mais comum de puberdade precoce é a ativação prematura do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal também conhecida como puberdade precoce dependente de gonadotrofinas ou puberdade precoce central (PPC). Esse tipo de puberdade ocorre de forma semelhante a puberdade fisiológica, porém em idade cronológica inadequada. Existe também a puberdade precoce independente da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (puberdade precoce independente de gonadotrofinas ou puberdade precoce periférica) (MACEDO et al., 2014).

A puberdade precoce é uma das condições clínicas mais comuns na endocrinologia pediátrica. Um estudo na Dinamarca encontrou uma incidência de 0,5 para cada 10.000 meninas abaixo de 2 anos, 0,05 para cada 10.000 meninas entre 2 e 4 anos e 8 para cada 10.000 meninas entre 5 e 9 anos e uma prevalência de 0,2% de puberdade precoce em meninas. É importante ressaltar que nesses dados estão inclusos casos de telarca precoce, adrenarca precoce e puberdade precoce central, sendo que a puberdade precoce central representou 46% desses casos (TEILMANN et al., 2005).

1.5 Puberdade Precoce Central (PPC)

Um estudo espanhol verificou que a puberdade precoce central é uma doença de baixa incidência (5,66 casos por milhão de pessoas de risco por ano) e prevalência (19 pra cada 100.000), sendo mais comum em meninas (risco 11 vezes maior) e mais comum em crianças adotadas (risco 25 vezes maior)(SORIANO-GUILLÉN et al., 2010).

A causa da puberdade precoce central em meninas, na grande maioria, é idiopática. Entre as causas orgânicas temos as secundárias à anormalidades no sistema nervoso central (tumores, malformações congênitas, infecções, processos inflamatórios, radiações, entre outros) e as sem anormalidades no sistema nervoso central (idiopática, causas genéticas, exposição a desreguladores endócrinos, entre outras).

O diagnóstico da puberdade precoce central é clínico e laboratorial. Na PPC os caracteres sexuais secundários são concordantes com o sexo do paciente, manifestando se inicialmente com o desenvolvimento das mamas no sexo feminino. Além do aparecimento dos caracteres sexuais secundários, ocorre também a aceleração da velocidade de crescimento e da maturação esquelética causando uma fusão prematura das epífises ósseas e consequentemente um comprometimento da estatura final. O diagnóstico laboratorial é feito pelas dosagens das gonadotrofinas e do estradiol em condições basais e quando necessário a dosagem de gonadotrofinas após estímulo com GnRH. Além disso, também deve ser realizada a determinação da idade óssea (MACEDO et al., 2014).

1.6 Eixo GH-IGF na PPC

A avaliação de crianças com puberdade precoce central já demonstrou que o eixo GH-IGF nesses casos apresenta as mesmas características do eixo na puberdade fisiológica. Os níveis de IGF-I e IGFBP3 encontram-se aumentados nos casos de puberdade precoce quando comparados com controles pré púberes

pareados por idade, mostrando que o aumento é devido o início da puberdade e não pela idade cronológica (JUUL et al., 1995; KANETY et al., 1996; SALES et al., 2003).

Não há relatos sobre o comportamento da IGFBP1 e da expressão do IGF1R mRNA em pacientes com puberdade precoce central.

1.7 Tratamento da PPC

O tratamento de escolha para a PPC são os análogos do GnRH. Antes da descoberta dessa medicação o tratamento da PPC não era eficiente. Com a descoberta que a pulsatilidade do LH poderia ser inibida pela infusão contínua de GnRH possibilitou a descoberta desse medicamento há mais de 30 anos. Diversos estudos já demonstraram que diferentes doses e formulações dessa medicação são seguras e bem toleradas. Os objetivos do tratamento são: interromper a puberdade até a idade adequada para o desenvolvimento puberal, desacelerar a maturação esquelética e consequentemente preservar o padrão familiar de estatura final além dos fatores psicossociais (CAREL et al., 2009).

1.8 O Eixo GH-IGF durante o tratamento da PPC

Durante o tratamento da puberdade precoce central com análogos do GnRH, ocorre a desaceleração da velocidade de crescimento para valores pré puberais. Portanto, esperava-se que também o eixo GH-IGF retornasse para valores pré-puberais. No entanto os trabalhos demonstram que os níveis de IGF-I e IGFBP3 não apresentam alteração significativa com o tratamento, mantendo-se alto apesar da queda da velocidade de crescimento (JUUL et al., 1995; KANETY et al., 1996; SONG et al., 2014; PELTEK KENDIRCI et al., 2015).

Sendo assim a queda da velocidade de crescimento observada durante o tratamento da PPC, não pode ser explicada pelos níveis séricos de IGF-I ou IGFBP3. Portanto questionamos se os análogos do GnRH bloqueiam outros componentes do eixo GH-IGF como por exemplo outras IGFBPs, o próprio IGF1R ou a cascata de sinalização pós receptor.

2 OBJETIVOS

Baseado nos questionamentos acima temos como objetivos:

2.1 Objetivo principal

Avaliar a expressão do gene do IGF1R mRNA em linfócitos de meninas com puberdade precoce central antes e durante o tratamento com análogos do GnRH.

2.2 Objetivos secundários

Avaliar os níveis de IGFBP1 de meninas com puberdade precoce central antes e durante o tratamento com análogos do GnRH.

Correlacionar a velocidade de crescimento de meninas com puberdade precoce central antes e durante o tratamento com análogos do GnRH com os parâmetros acima.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

Foram realizados dois tipos de estudos:

O Estudo 1 foi transversal.

O Estudo 2 foi longitudinal prospectivo realizado somente com seis pacientes.

3.2 Pacientes

O grupo de pacientes do estudo foi formado por uma amostra de conveniência de meninas com PPC atendidas no Ambulatório de Endocrinologia Infantil do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP).

Critérios de inclusão: o diagnóstico de PPC foi realizado mediante avaliação clínica (aparecimento dos caracteres sexuais secundários antes dos 8 anos) e/ou laboratorial (LH basal maior que 0,6 mU/ml ou pico de LH maior que 6,9 mU/ml após estímulo com 100µg de GnRH endovenoso) (BRITO et al., 1999).

Apenas 2 meninas não preencheram os critérios laboratoriais mas como apresentavam clínica exuberante e foram descartados outros diagnósticos diferenciais optamos por mantê-las no estudo.

Foram estudadas 26 meninas com o diagnóstico de PPC e idade entre 6,3 e 10,8 anos, ($8,7 \pm 1,05$).

3.3 Controles

Esse grupo foi composto por dezoito crianças saudáveis, 10 do sexo masculino e 8 do sexo feminino, todos pré-púberes, com idade entre 5,1 e 9,5 anos, ($7,3 \pm 1,4$ anos), com peso e estatura adequados para a idade em seguimento de puericultura na cidade de Serrana.

Os controles para serem considerados pré púberes não apresentavam nenhum caractere sexual secundário no momento da avaliação e 6 meses após. Uma criança que não apresentava sinais de puberdade no momento da avaliação mas iniciou a puberdade nos 6 meses consecutivos, foi retirada do grupo.

Foram excluídas crianças portadoras de doenças crônicas, doenças genéticas, nutricionais ou outras alterações hormonais além da PPC ou que, no momento da coleta, apresentassem qualquer sinal de afecção aguda.

3.4 Termo de Consentimento

Os responsáveis assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido autorizando que as crianças (casos e controles) participem do estudo (Anexo 1)

3.5 Comitê de Ética

Esse trabalho, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Ofício nº3335/2011 (Anexo 2)

3.6 Desenho Experimental

Das 26 participantes do estudo, 16 foram avaliadas antes do início do tratamento, ou seja, no momento do diagnóstico de PPC conforme os critérios citados acima, constituindo o grupo A. Dessas 16 meninas foi feito diagnóstico pelo LH basal em 4 meninas e em 11 meninas foi realizado o teste de estímulo com LHRH para o diagnóstico. Apenas 1 menina não preencheu critério laboratorial mas preencheu critérios clínicos e foi descartado outros diagnósticos diferenciais. Outras 16 meninas foram avaliadas já em uso regular do análogo do GnRH por pelo menos

5 meses constituindo o grupo B. Desse grupo o diagnóstico laboratorial foi feito com LH basal em 5 meninas e com o teste LHRH em 10 meninas. Apenas 1 menina não preencheu critério laboratorial mas preencheu critérios clínicos e foi descartado outros diagnósticos diferenciais. Foram incluídas no grupo B apenas pacientes que apresentavam sinais clínicos de bloqueio puberal (diminuição da velocidade de crescimento e não progressão dos caracteres sexuais secundários) ou dosagem de $LH < 6,6$ em amostra coletada 2 horas após aplicação da medicação. (BRITO et al., 2004). Uma paciente foi excluída desse grupo pois apresentou características clínicas e laboratoriais de não supressão do eixo gonadal apesar do tratamento. Apenas seis pacientes participaram do estudo em dois momentos, no diagnóstico de PPC e depois em uso do análogo do GnRH, as demais pacientes participaram do estudo somente em um momento. O estudo 2 se refere a análise separada dessas 6 meninas seguidas prospectivamente.

Não foi realizado um estudo prospectivo com todas as pacientes pois na época da coleta de dados ocorreu um problema com o fornecimento da medicação pela farmácia de alto custo e as meninas que fizeram o diagnóstico nesse período e estavam no grupo A, tiveram um longo período de fornecimento irregular da medicação e por esse motivo optamos por fazer um grupo B com meninas que já estavam em seguimento e com fornecimento regular da medicação. As seis meninas que conseguiram um fornecimento regular nesse período foram avaliadas prospectivamente.

Outro problema que tivemos durante a coleta de dados foi a mudança do método de dosagem do LH de Imunofluorimétrico para Quimiluminescência. Nessa época optamos por parar a coleta de novos casos e formar um grupo homogêneo em relação a dosagem laboratorial de LH.

Foi realizada revisão criteriosa dos prontuários e coletado dados de peso, estatura, velocidade de crescimento, índice de massa corpórea (IMC) e o estágio puberal e idade óssea de todos os participantes e foi considerado o dado mais próximo da coleta de sangue. O peso foi aferido com as crianças utilizando roupas leves, sem sapato e em balança digital com capacidade de diferenciação de 100 gramas. A estatura foi medida em antropômetro vertical graduado em milímetros. Essas duas medidas foram realizadas pela equipe da enfermagem do Ambulatório de Endocrinologia Infantil. O IMC foi calculado pela razão entre o peso (Kg) e o quadrado da estatura (metros). A avaliação do estágio puberal seguiu os critérios de

Tanner e foi realizada por médicos da equipe da Endocrinologia Infantil (MARSHALL; TANNER, 1969). A velocidade de crescimento e idade óssea não foram verificados no grupo controle. Para obtenção dos escores Z de estatura e IMC para idade foi utilizado um software WHO AnthroPlus desenvolvido pela Organização Mundial De Saúde (OMS).

As características de cada grupo estão resumidas na tabela 1:

Tabela 1: Características clínicas; gênero, idade, velocidade de crescimento, tempo de tratamento (média e desvio padrão), Escore Z de estatura e IMC (mediana e intervalo interquartil), e características laboratoriais; LH basal, pico pós estímulo com GnRH endovenoso e 2h após aplicação do análogo do GnRH de depósito e característica radiológica da idade óssea (média e desvio padrão) de cada grupo. O símbolo * demonstra os dados que apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$).

	Controles	Grupo A	Grupo B
Genero	10M/8F	16F	16F
Idade	7,3 ± 1,4	8,1 ± 0,6	9,3 ± 0,8 *
EDP Estatura	-0,45 * (-0,73;+0,15)	+1,27 (+1,10;+2,04)	+1,47 (+0,65;+2,48)
VC	-----	9,1 ± 1,9	5,4 ± 1,4*
EDP IMC	0,34 * (-0,59;+0,79)	1,05 (+0,50; +2,00)	1,77 (+0,98; +2,77)
LH BASAL DIAGNOSTICO	-----	2,5 (MIN:1,2 MÁX :8,6)	1,8 (MIN: 0,7 MAX: 5,6)
PICO LHRH DIAGNOSTICO	-----	14,9 (MIN:3,2 MÁX:44)	11 (MIN:3,5 MÁX: 44)
LH Pós Lupron	-----	-----	3,3 (MIN:0,6 MÁX:6,4)
IO	-----	10,7 ± 1,1 anos	11,9 ± 1,2 anos*
Tempo tto em meses	-----	-----	11,4± 7,8

3.7 Coleta de sangue

De todos participantes, incluindo o grupo controle, foi coletado sangue para dosagem de IGF-I, IGFBP-1, IGFBP-3, insulina e análise da expressão do mRNA do IGF1R em linfócitos periféricos.

A coleta de sangue foi realizada por punção venosa, após jejum de 8 a 10 horas, em um único momento tanto no grupo controle como nos grupos com PPC. No grupo A o sangue foi coletado antes do início do tratamento e nas avaliações durante o tratamento (Grupo B) foi colhido sangue 2h após aplicação do análogo do GnRH, junto com a dosagem de LH para avaliar eficácia do tratamento.

Foram coletados aproximadamente 6ml de sangue. As amostras foram imediatamente processadas para extração do mRNA que foi mantido a -70°C até o momento de análise. Os soros foram congelados a -20°C até o momento da dosagem.

3.8 Dosagens laboratoriais

Todas as dosagens foram realizadas em duplicata. Todas as amostras dos grupos A e B foram dosadas no mesmo ensaio. Algumas dosagens do grupo controle foram feitas em outro ensaio porém utilizando o mesmo método e o mesmo laboratório, somente em dias diferentes.

3.8.1 Imunoensaios

3.8.1.1 Imunoensaio do IGF-I

A dosagem do IGF-I foi realizada no Laboratório de Endocrinologia e Metabologia do Departamento de Clínica Médica do HCFMRP-USP utilizando ensaio

imunométrico de fase sólida revelado por quimiluminescência (IMMULITE 2000, SIEMENS).

A sensibilidade analítica foi de 20ng/ml. O coeficiente de variação interensaio foi de 6,04% e o coeficiente de variação intraensaio foi de 2,4%. Os resultados foram expressos em ng/ml.

3.8.1.2 Imunoensaio da IGFBP-3

A dosagem da IGFBP-3 foi realizada no Laboratório de Endocrinologia e Metabologia do Departamento de Clínica Médica do HCFMRP-USP utilizando ensaio imunométrico de fase sólida revelado por quimiluminescência (IMMULITE 2000, SIEMENS).

A sensibilidade analítica foi de 0,1mg/L. O coeficiente de variação interensaio foi de 3,42% e o coeficiente de variação intraensaio foi de 2,3%. Os resultados foram expressos em mg/L.

3.8.1.3 Imunoensaio da IGFBP-1

A dosagem quantitativa de IGFBP-1 foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Pediatria do HCFMRP-USP utilizando método ELISA (Kit RayBio Human IGF-BP-1).

A sensibilidade analítica foi de 5 ng/ml. O coeficiente de variação intraensaio foi 3,3%. Todas as amostras foram dosadas no mesmo ensaio. Os resultados foram expressos em ng/ml.

3.8.1.4 Imunoensaio da insulina

A dosagem de insulina foi realizada no Laboratório de Endocrinologia e Metabologia do Departamento de Clínica Médica do HCFMRP-USP utilizando ensaio imunoradiométrico (IRMA).

A sensibilidade analítica foi de 0,5Uui/ML. O coeficiente de variação intraensaio foi de 6,6%. Todas as amostras foram dosadas no mesmo ensaio. Os resultados foram expressos em uIU/ml.

3.8.1.5 Imunoensaio de LH

A dosagem do hormônio luteinizante (LH) foi realizada no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica do HCFMRP-USP utilizando ensaio fluorimétrico de fase sólida (AutoDELFIA). O coeficiente de variação interensaio foi de 5.2%.

3.8.2 Avaliação da expressão do gene do IGF1R

A avaliação da expressão do gene do receptor tipo 1 do IGF foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Pediatria do HCFMRP-USP.

Para essa avaliação foi extraído mRNA de linfócitos periféricos após separação pela técnica do TRISOL. O mRNA extraído foi quantificado por espectrofotometria de onda em aparelho Gene Quant Pro Spec® (Amersham Bioscience) e depois convertido a cDNA usando o kit High Capacity da Applied. Esse Kit contém todos os reagentes necessários para a transcrição reversa do RNA para cDNA. Foi utilizado 2,5 ul de tampão, 2,5 ul de primer, 1,0 ul DNTPs, 0,63ul de inibidor da RNAase, 1,25ul de MultScribe, 500ng de mRNA e água para completar reação até 25ul. Colocado em termociclador por 10 minutos a 25° e depois 2 horas a 37° sendo então estocada a -20° até o momento da qPCR. Foi feita análise em duplicata dessas amostras para o gene do IGF1R e dois genes de referência; gene

da $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) e da β -glucoronidase ($GUS\beta$), por técnica de PCR em tempo real (PCR quantitativo). Foi utilizado 5,4ul do cDNA na diluição de 1:50 e 6ul de Master Mix Fast com 0,6ul de sonda específica TaqMan® (Applied Biosystems, EUA) para cada poço. Como calibrador foi utilizada amostra obtida de um indivíduo do grupo controle com peso e estatura adequados para idade. Essas reações realizadas no aparelho 7500 Fast Real Time PCR System® V.2.0.6 (Applied Biosystems, EUA). As análises foram preparadas em duplicatas imersas em gelo e sob a proteção da luz em placas de polipropileno próprias para essa reação (APPLIED BIOSYSTEMS, 2009; CUSTODIO et al., 2012; RICCO, 2014).

3.9 Análise Estatística

Os valores das variáveis sem distribuição normal (expressão do IGF1R, IGF-I, IGFBP-3) estão descritos através de medianas e intervalos interquartis (mediana; interv.interq.)

Os valores das variáveis com distribuição normal (estatura, idade, velocidade de crescimento) estão descritos como médias e desvios-padrão (média $\pm$ DP)

A comparação entre 2 grupos sem distribuição normal foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, enquanto as diferenças entre dois grupos com distribuição normal foram testadas pelo teste *t-student*.

Para comparação entre os 3 grupos foi utilizado Análise de Variância (ANOVA) para variáveis de distribuição normal e o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para as variáveis sem distribuição normal. Para o estudo das correlações foi utilizado o coeficiente de correlação de Sperman.

Valores de estatura, peso e IMC foram ajustados para idade e sexo calculando-se o escore do desvio padrão (EDP) para sexo e idade cronológica com auxílio do software WHO AnthroPlus.

Valores de IGF-I foram ajustados para idade e sexo da seguinte maneira: subtraindo do valor obtido o valor correspondente ao percentil 50 para sexo e idade e após dividindo pelo valor no percentil 50, (valor – p50 / p50). Dessa forma o resultado do IGF-I ajustado igual ao zero corresponde ao p50, valores positivos estão acima do p50 e valores negativos abaixo do p50 para sexo e idade. Foi

utilizada a referência Immulite 2000 para determinar o valor do p50 (BEDOGNI et al.,).

Para as análises pareadas foi realizado o teste de Wilcoxon.

Para avaliar expressão relativa do gene do IGF1R foi utilizado o método do $2^{-\Delta\Delta CT}$ onde o ΔCT é igual a diferença entre o grupo de estudo e o controle, do ponto de corte do número de ciclos a partir do qual a fluorescência torna-se detectável (threshold). O valor de $2^{-\Delta\Delta CT}$ representa a magnitude da mudança na expressão gênica em relação ao controle (Livak e Schmittgen, 2001). Arbitrariamente foram consideradas como tendo expressão aumentada as amostras que exibirem valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ superiores a 2. Na análise além do teste de Kruskal-Wallis foi também utilizado o Teste de Fisher.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa de análise estatística GraphPadPrism. Foi considerado como estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DO ESTUDO 1

4.1.1 IGF1R (mRNA)

A expressão relativa do gene IGF1R ($2^{-\Delta\Delta CT}$), quando comparado os 3 grupos juntos, foi significativamente maior no Grupo B (2,41; 1,21-12,41) em relação ao grupo controle (1,15; 0,70-1,72) ($p=0,008$). Não foi vista diferença estatística quando comparado o grupo B com o grupo A (1,32; 1,02-1,85). Também não foi constatada diferença estatística entre o grupo A e controle.

Ao compararmos os grupos em pares observamos que a expressão relativa do gene IGF1R ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi significativamente maior no Grupo B em relação ao grupo controle ($p=0,004$) e também foi maior quando comparado ao grupo A ($p=0,04$). Não foi observado diferença estatística entre o Grupo A e o grupo controle ($p=0,17$).

Quando consideramos valores de $2^{-\Delta\Delta CT} \geq 2$ como aumentados observamos que no Grupo B 9 de 16 pacientes apresentam expressão aumentada do mRNA do IGF1R enquanto no Grupo controle apenas 2 de 18 ($p=0,009$). Comparando o Grupo B e o Grupo A, onde apenas 3 de 16 apresentam valores aumentados, a diferença foi marginal com valor de $p=0,06$. Não foi observada diferença entre grupo controle e grupo A. (Figura 1)

Figura 1: Expressão do mRNA do gene do IGF1R nos indivíduos controles (verde), pacientes do Grupo A (azul) e do Grupo B (vermelho). A barra contínua representa mediana e a linha tracejada representa o valor de 2 assumido como limite superior.

4.1.2 IGF-I

As concentrações séricas o IGF-I foram estatisticamente maiores no Grupo A (394,5; 321,3-457,8) e Grupo B (417,5; 368,3-520,3) em relação ao controle (143,5; 122-190,8) e não houve diferença estatística entre os grupos A e B ($p < 0,0001$).

Ao compararmos os grupos em pares observamos que as concentrações séricas o IGF-I foram estatisticamente maiores no Grupo A em relação ao controle ($p < 0,0001$) e também foram maiores no grupo B em relação ao controle ($p < 0,0001$). Não houve diferença estatística entre os grupos A e B ($p = 0,39$). (Figura 2)

Figura 2: Concentrações séricas de IGF-I nos indivíduos indivíduos controles (verde), pacientes do Grupo A (azul) e do Grupo B (vermelho). A barra contínua representa mediana.

4.1.3 IGF-I ajustado (valor - p50 / p50)

Os valores do IGF-I ajustado foram estatisticamente maiores no Grupo A (1,10; 0,67-1,46) e Grupo B (0,84; 0,53-1,29) em relação ao controle (0,08; -0,19-0,49) e não houve diferença estatística entre os grupos A e B ($p < 0,0001$).

Ao compararmos os grupos em pares observamos que os valores do IGF-I ajustado foram estatisticamente maiores no Grupo A em relação ao controle ($p = 0,0004$) e também foram maiores no grupo B em relação ao controle ($p = 0,0004$). Não houve diferença estatística entre os grupos A e B ($p = 0,36$). (Figura 3)

Figura 3: Valores do IGF-I ajustado para sexo e idade (valor – p50 / p50) nos indivíduos controles (verde), pacientes do Grupo A (azul) e do Grupo B (vermelho). A barra contínua representa mediana e a pontilhada o percentil 50.

4.1.4 IGFBP-3

As concentrações séricas de IGFBP-3 foram estatisticamente maiores nos grupos A (4,87; 4,27-5,88) e B (5,58; 4,76-6,09) em relação ao controle (3,93; 3,10-4,26), porém não houve diferença estatística entre os grupos A e B ($p < 0,0001$)

Ao compararmos os grupos em pares observamos que as concentrações de IGFBP-3 no grupo controle foi menor que nos grupos A ($p = 0,007$) e B ($p < 0,0001$) e não foi observada diferença entre os Grupos A e B ($p = 0,22$). (Figura 4)

Figura 4: Concentrações séricas de IGFBP-3 nos indivíduos controles (verde), pacientes do Grupo A (azul) e do Grupo B (vermelho). A barra contínua representa mediana.

4.1.5 Relação Molar IGF-I/IGFBP3

A relação molar entre IGF-I e IGFBP-3 foi significativamente maior nos grupos A (0,29; 0,26-0,34) e B (0,28; 0,25-0,33) quando comparados ao grupo controle (0,15; 0,13-0,18) e não houve diferença entre os grupos A e B ($p < 0,0001$).

Ao compararmos os grupos em pares observamos que a relação molar foi significativamente maior nos grupos A e B em relação ao controle ($p < 0,0001$) e não houve diferença entre os grupos A e B ($P = 0,98$). (Figura 5)

Figura 5: Relação Molar entre concentrações de IGF-I e IGFBP-3 nos indivíduos controles (verde), pacientes do Grupo A (azul) e do Grupo B (vermelho). A barra contínua representa mediana.

4.1.6 IGFBP-1

As concentrações séricas de IGFBP-1 foram significativamente maiores no grupo controle (38,4; 24,7-64,1) quando comparado aos grupos A (7,00, 3,84-15,07) e B (2,61; 1,70-6,79), porém não houve diferença estatística entre os grupos A e B ($p < 0,0001$).

Ao compararmos os grupos em pares observamos que as concentrações séricas de IGFBP-1 foram significativamente maiores no grupo controle quando comparado aos grupos A e B ($p < 0,0001$), porém não houve diferença estatística entre os grupos A e B ($p = 0,31$). (Figura 6)

Figura 6: Concentrações séricas de IGFBP-1 nos indivíduos controles (verde), pacientes do Grupo A (azul) e do Grupo B (vermelho). A barra contínua representa mediana.

4.1.7 IGFBP-1 menor que 5 ng/ml (indetectável)

Ao considerarmos os valores de IGFBP-1 menores que 5 ng/ml como indetectáveis (segundo orientação do kit utilizado) observamos que nenhum dos controles apresentou níveis indetectáveis, porém nos grupos A e B tivemos pacientes com níveis menores que 5 (Figura 6).

Ao compararmos somente os grupos A e B, o grupo B apresentou número estatisticamente maior de valores indetectáveis quando comparado com o grupo A. ($p=0,01$). (Figura 7)

Figura 7: Concentrações séricas de IGFBP-1 nos indivíduos do Grupo A (azul) e do Grupo B (vermelho). A barra contínua representa mediana e a pontilhada a concentração de 5 ng/ml.

4.1.8 Insulina

As concentrações séricas de insulina foram significativamente menores no grupo controle (3,6; 2,5-5,6) quando comparado ao grupo A (8,3; 5-13,5) e não houve diferença quando comparado ao grupo B (7,00; 4,5-10,5). Também não houve diferença entre os grupos A e B ($P=0,010$).

Ao compararmos os grupos em pares observamos que as concentrações séricas de insulina foram estatisticamente menores no grupo controle em relação ao grupo A ($p=0,005$) e uma tendência a valores menores, porém não significativos, quando comparado ao grupo B ($P=0,06$). Não houve diferença entre os grupos A e B ($p=0,27$). (Figura 8)

Figura 8: Concentrações séricas de Insulina nos indivíduos controles (verde), pacientes do Grupo A (azul) e do Grupo B (vermelho). A barra contínua representa mediana.

4.1.9 Correlações

Não encontramos correlação entre dos valores do IGF1R com a velocidade de crescimento, tempo de tratamento ou índice de massa corporal no grupo B

Figura 9: Correlação dos valores do IGF1R com a velocidade de crescimento, tempo de tratamento e IMC nas pacientes do grupo B

4.1.10 Resumo dos resultados (Tabela 2)

Tabela 2: Resumo dos principais resultados (média e intervalo interquartil) dos 3 grupos participantes do estudo.

	CONTROLE	Grupo A	Grupo B
IGF1R ($2^{-\Delta\Delta CT}$),	1,150 (0,70; 1,72)	1,321 (1,02; 1,85)	2,335 (1,10; 11,5)
IGF-I (ng/ml)	143,5 (122; 190,8)	394,5 (321,3; 457,8)	437 (368,5; 532,5)
IGFBP-3 (mg/L)	3,93 (3,10; 4,26)	4,87 (4,27; 5,88)	5,73 (4,79; 6,19)
Relação molar	0,153 (0,135; 0,181)	0,293 (0,265; 0,345)	0,292 (0,257; 0,344)
IGFBP-1 ng/ml	38,45 (24,76; 64,16)	7,00 (3,84; 15,07)	2,61 (1,44; 8,62)
Insulina uIU/ml.	3,6 (2,5; 5,6)	8,3 (5; 13,5)	7,00 (4,5; 10,5)

4.2 Resultados do Estudo 2

4.2.1 IGF1R (mRNA)

Ao compararmos as mesmas meninas antes e durante o tratamento da puberdade precoce observamos que a expressão relativa do gene IGF1R ($2^{-\Delta\Delta CT}$) aumentou significativamente durante o tratamento com análogos do GnRH ($p=0,008$). (Figura 9)

Figura 9: Expressão relativa do gene IGF1R ($2^{-\Delta\Delta CT}$) antes (Grupo A) e durante o tratamento (Grupo B) com análogos do GnRH nas 6 meninas seguidas prospectivamente.

4.2.2 IGF-I

As concentrações séricas o IGF-I não apresentaram diferenças significativas antes e durante o tratamento da puberdade precoce com análogos do GnRH ($p=1,00$). (Figura 10).

Figura 10: Concentrações séricas o IGF-I antes (Grupo A) e durante o tratamento (Grupo B) com análogos do GnRH nas 6 meninas seguidas prospectivamente.

4.2.3 IGFBP-3

As concentrações séricas de IGFBP-3 não apresentaram diferenças significativas antes e durante o tratamento da puberdade precoce com análogos do GnRH ($p=0,81$). (Figura 11).

Figura 11: Concentrações séricas o IGFBP-3 antes (Grupo A) e durante o tratamento (Grupo B) com análogos do GnRH nas 6 meninas seguidas prospectivamente.

4.2.4 Relação Molar IGF-I/IGFBP-3

A relação molar entre IGF-I e IGFBP-3 não apresentou diferença significativa antes e durante o tratamento da puberdade precoce com análogos do GnRH ($p=0,93$). (Figura 12)

Figura 12: Relação molar entre IGF-I e IGFBP-3 antes (Grupo A) e durante o tratamento (Grupo B) com análogos do GnRH nas 6 meninas seguidas prospectivamente.

4.2.5 Escore de desvio padrão da estatura

O EDP de estatura não apresentou diferença significativa antes e durante o tratamento da puberdade precoce com análogos do GnRH ($p=0,81$). (Figura 13).

Figura 13: Escore de desvio padrão de estatura antes (Grupo A) e durante o tratamento (Grupo B) com análogos do GnRH nas 6 meninas seguidas prospectivamente.

4.2.6 Escore de desvio padrão do IMC

O EDP do IMC não apresentou diferença significativa antes e durante o tratamento da puberdade precoce com análogos do GnRH ($p=0,69$). (Figura 14).

Figura 14: Escore de desvio padrão do IMC antes (Grupo A) e durante o tratamento (Grupo B) com análogos do GnRH nas 6 meninas seguidas prospectivamente

5 DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos de forma original que a expressão do mRNA do IGF1R aumenta significativamente em meninas com puberdade precoce central em tratamento para o bloqueio puberal com análogo do GnRH. Este achado acompanhou-se de desaceleração significativa da velocidade de crescimento, porém com manutenção das concentrações elevadas de IGF-I e IGFBP-3. Como verificamos uma diminuição da velocidade de crescimento com altas concentrações de IGF-1 e IGFBP-3 acreditamos que exista uma diminuição da bioatividade do IGF-I. Como a expressão do mRNA do receptor de IGF-I apresentou-se elevada, acreditamos que esse bloqueio da ação do IGF-I seja pós receptor. Alguns autores já demonstraram que em situações de aumento dos níveis de estrógeno, ocorre um aumento da expressão de alguns genes da cascata pós receptor tipo 1 de IGF (COOKMAN; BELCHER, 2015). Sendo assim, sugerimos que o bloqueio da puberdade precoce central pelo análogo do GnRH leva a uma diminuição dos níveis de estradiol e esses por sua vez irão provocar um bloqueio na cascata pós receptor de IGF com consequente diminuição da atividade do eixo GH-IGF, e essa resposta do receptor funcione como um mecanismo compensatório..

Esse aumento da expressão do mRNA do IGF1R em situações de diminuição da bioatividade do IGF já foi observado pelo nosso grupo em outras populações como pacientes com hipóxia e pacientes com baixa estatura idiopática com dados laboratoriais sugestivos de resistência ao GH/ IGF (SADER MILANI, 2009; CUSTODIO et al., 2012). Entretanto o nosso grupo também já observou aumento da expressão do mRNA do IGF1R em situações de aumento da bioatividade do IGF, por exemplo, em crianças com obesidade primária e aumento da velocidade de crescimento (RICCO, 2014).

Os trabalhos citados acima sugerem que o receptor tipo 1 do IGF pode apresentar uma regulação bifásica com a expressão aumentada nos dois extremos de bioatividade do IGF-I formando uma curva em U. (ANEXO 3)

Não há estudos sobre a expressão fisiológica do IGF1R ao longo da vida para correlacionar a expressão com a idade, o sexo e o estadiamento puberal. Esse estudo demonstra pela primeira vez que não ocorre mudança significativa na expressão do IGF1R com o início da puberdade. Porém temos um pequeno número de casos e são necessários mais estudos para confirmar esse achado.

Nesse estudo encontramos, níveis séricos de IGF-I e IGFBP-3 significativamente maiores em crianças com puberdade precoce quando

comparadas com crianças pré-púberes. Esses resultados são concordantes com a clínica, pois durante a puberdade precoce ocorre além do aparecimento dos caracteres sexuais secundários, o estirão de crescimento e sabemos que o eixo GH-IGF constitui a via final mediante a qual a maioria dos fatores que atuam no processo de crescimento exerce sua ação. Outros autores já demonstraram que durante a puberdade fisiológica ocorre um aumento da liberação do GH em meninas e que as concentrações séricas tanto do IGF-I quanto da IGFBP-3 atingem os maiores valores durante a puberdade fisiológica (WENNINK et al., 1991; JUUL et al., 1994; JUUL; DALGAARD; SKAKKEBAEK, 1995). Em pacientes com puberdade precoce também já foi descrito esse aumento dos níveis séricos de IGF-I e IGFBP3 com início da puberdade (JUUL et al., 1995; KANETY et al., 1996; SALES et al., 2003).

O grupo controle foi composto por crianças do sexo masculino e feminino enquanto os casos foram somente do sexo feminino. Esse fato ocorreu devido a dificuldade de se obter um grupo controle composto por crianças saudáveis e aceitamos a inclusão de crianças do sexo masculino no grupo controle pois já é conhecido que o eixo GH/IGF apresenta maior diferença entre os sexos na época da puberdade e o grupo controle foi composto por crianças pré púberes (JUUL et al., 1994). Para neutralizar essa limitação realizamos o IGF-I ajustado para sexo e idade (valor do paciente – valor p50 para sexo e idade / valor no p50 para sexo e idade) (BEDOGNI et al.,). O resultado da análise estatística do IGF-I corrigido para sexo e idade foi muito semelhante aos resultados do IGF-I e não modificou a conclusão dos dados.

Observamos também que esse aumento do IGF-I e da IGFBP-3 na puberdade precoce não é linear apresentando um aumento maior do IGF-I em relação a IGFBP-3 o que pode ser demonstrado pelo aumento da relação molar entre IGF-I/IGFBP-3. Outros autores já demonstram esse aumento da relação molar tanto na puberdade fisiológica quanto na precoce e defendem a hipótese de que, com aumento da relação molar, o IGF-I bioativo circulante estará aumentado e isso explicaria o estirão de crescimento que ocorre durante a puberdade (JUUL; DALGAARD; SKAKKEBAEK, 1995; SALES et al., 2003).

Verificamos também que os níveis séricos da IGFBP-1 diminuem com o início da puberdade precoce. Outros autores já descreveram que os níveis séricos da IGFBP-1 caem na época da puberdade fisiológica (JUUL; DALGAARD;

SKAKKEBAEK, 1995). Não há relatos na literatura sobre os níveis da IGFBP-1 em meninas com puberdade precoce central.

Avaliamos também os níveis séricos de insulina os quais apresentaram um aumento significativo com o início da puberdade precoce. Diversos autores já descreveram uma resistência insulínica com o início da puberdade, seja ela fisiológica ou precoce. Na puberdade fisiológica já foi descrito uma significativa redução da sensibilidade insulínica com maior secreção de insulina acompanhados de uma produção de glicose hepática diminuída, porém sem alterações nos níveis séricos da glicemia de jejum. Esses estudos sugerem que as alterações no eixo GH/IGF durante a puberdade podem contribuir para essa resistência insulínica (MORAN et al., 2002; HANNON; JANOSKY; ARSLANIAN, 2006). Em meninas com puberdade precoce central, também já foi descrito a presença de resistência insulínica e quando comparadas com controles pareados para o estadiamento puberal, os casos de puberdade precoce apresentaram uma produção ainda maior de insulina, sugerindo um perfil metabólico desfavorável nessas pacientes (SØRENSEN et al., 2010). Ao avaliarmos os pacientes do grupo controle e do grupo A, ou seja somente os indivíduos que não estavam recebendo medicação, observamos uma correlação negativa ($r = -0,5$; $p = 0,007$) entre as concentrações de IGFBP-1 e as de insulina.

Crianças com puberdade precoce central apresentam um estirão de crescimento em idade mais precoce e quando iniciamos o tratamento com análogos do GnRH, essas crianças apresentam além do bloqueio do eixo gonadal uma diminuição significativa da velocidade de crescimento, sendo assim, nosso estudo também comparou as concentrações séricas de IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-1 e a expressão do mRNA do IGF1R em meninas com puberdade precoce, antes e durante o tratamento com análogos do GnRH.

A velocidade de crescimento apresentou uma queda estatisticamente significativa passando de uma média de 9,1cm/ano no grupo A para 5,4 cm/ano no grupo B ($p = 0,0005$). O escore Z de estatura foi menor no grupo controle quando comparado com os grupos A e B, esse resultado está dentro do esperado e compatível com a clínica dos pacientes. Porém não encontramos diferença entre os grupos A e B apesar da queda significativa da velocidade de crescimento. O mesmo fato ocorreu com a idade óssea. A média da idade óssea no grupo A foi de 10,7 anos enquanto a média da idade cronológica foi 8,1 anos dando assim um avanço

de 2,6 anos da idade óssea em relação a idade cronológica. No grupo B a média da idade óssea foi 11,9 anos enquanto a média da idade cronológica foi 9,3 anos dando assim um avanço também de 2,6 anos da idade óssea em relação a idade cronológica. Acreditamos que com a normalização da velocidade de crescimento conseguimos manter o desvio em relação ao p50 da estatura e da idade óssea em relação a idade cronológica, evitando um aumento desse desvio caso o tratamento não tivesse sido prescrito já que o grupo B apresentou características clínicas e laboratoriais de bloqueio puberal. Além disso, é importante ressaltar que o nosso grupo tratado foi heterogêneo em relação ao tempo de tratamento e as meninas com pouco tempo de tratamento podem ainda não apresentar diminuição do escore Z de estatura e diminuição do avanço de idade óssea. Não achamos uma correlação significativa entre esses dados, mas acreditamos que isso ocorreu pelo número limitado de pacientes no estudo. Outro fato é que apenas 6 meninas participaram do grupo A e do grupo B, os demais pacientes participaram apenas em um momento dificultando essa análise.

Em relação ao escore Z do IMC foi menor no grupo controle quando comparado com os grupos A e B. Esse resultado está dentro do esperado já que para ser incluso no grupo controle era necessário ter peso e estatura adequados para idade. Quando comparamos os três grupos em conjunto, não observamos diferença no escore Z do IMC entre os grupos A e B. Porém observamos que a mediana do grupo A foi de +1,05 escore Z IMC enquanto a mediana do grupo B foi +1,77 escore Z IMC, valor este muito próximo do diagnóstico de obesidade. Sendo assim optamos por comparar os grupos A e B separadamente e verificamos uma tendência a um escore Z IMC maior no grupo tratado, porém não significativo ($p=0,07$). No grupo A, 4 das 16 meninas (25%) apresentavam diagnóstico de sobrepeso e 4 (25%) diagnóstico de obesidade. No grupo B, 5 das 16 (31%) meninas apresentaram diagnóstico de sobrepeso e 7 das 16 (43%) apresentaram diagnóstico de obesidade, sendo que apenas 4 meninas apresentaram diagnóstico de eutrofia durante o uso do análogo do GnRH. A maioria dos estudos já publicados que avaliaram o IMC de meninas com puberdade precoce relatam uma alta prevalência de sobrepeso e obesidade nessas meninas, porém isso não se modifica com o tratamento com análogos do GnRH (HEGER; PARTSCH; SIPPELL, 1999; PALMERT et al., 1999; PASQUINO et al., 2008). Um único trabalho demonstrou uma

diminuição IMC e da prevalência de obesidade após o 2 anos de tratamento com análogos do GnRH (ARRIGO et al., 2004).

Os níveis séricos de IGF-I, IGFBP-3 assim como a relação molar entre IGF-I/IGFBP-3 não apresentaram diferença significativa quando comparamos os grupos de meninas com puberdade precoce antes e após o início do tratamento medicamentoso.

Sendo assim demonstramos que a queda da velocidade de crescimento induzida pelo análogo do GnRH nas pacientes com puberdade precoce não é secundária a uma queda nos níveis séricos de IGF-I ou IGFBP-3. Esses dados são conflitantes na literatura.

Autores de uma publicação mais antiga relataram uma queda nos níveis da Somatomedina C com o uso de análogos do GnRH, porém estudos posteriores, inclusive estudos recentes, não encontraram esses resultados e diversos autores descrevem que não há uma diminuição dos níveis séricos de IGF-I com o tratamento com análogos do GnRH apesar de uma significativa queda na velocidade de crescimento (HARRIS et al., 1985; JUUL et al., 1995; KANETY et al., 1996; SONG et al., 2014; PELTEK KENDIRCI et al., 2015).

Dados na literatura sobre o comportamento da IGFBP-3 durante o uso de análogos do GnRH são ainda mais controversos. Alguns autores, assim como o presente o estudo, não observaram diferença significativa nos níveis séricos de IGFBP-3 com uso de análogos do GnRH (KANETY et al., 1996; SONG et al., 2014). Outros autores descrevem uma diminuição do IGFBP-3 corrigido para o desvio padrão de idade e sexo (PELTEK KENDIRCI et al., 2015). Há ainda autores que descrevem um aumento significativo dos níveis de IGFBP-3 com uso de análogos do GnRH (JUUL et al., 1995).

Os níveis séricos de IGFBP-1 não apresentaram diferença estatística entre os grupos com e sem tratamento. Não há na literatura dados sobre o comportamento da IGFBP-1 durante o tratamento com análogos do GnRH. Porém quando consideramos as concentrações de IGFBP-1 ≥ 5 e <5 observamos que o grupo B apresenta significativamente mais valores de IGFBP-1 abaixo de 5 que o grupo A ($P=0,01$) mostrando assim uma tendência a valores menores de IGFBP-1 no grupo B., sendo os níveis séricos de IGFBP-1 também não explicam a diminuição da velocidade de crescimento com o tratamento pois para justificar uma diminuição da bioatividade do IGF-I esperaríamos níveis elevados de IGFBP-1.

Não encontramos diferença estatística nos níveis séricos de insulina quando comparamos o grupo tratado com o não tratado, porém existe relatos de uma piora da resistência insulínica com o tratamento com análogos do GnRH (SØRENSEN et al., 2010). Apesar das concentrações semelhantes de insulina nos grupos A e B, ao compararmos os grupos em pares observamos que as concentrações séricas de insulina foram estatisticamente menores no grupo controle em relação ao grupo A ($p=0,005$) e uma tendência a valores menores, porém não significativos, quando comparado ao grupo B ($P=0,06$) e não houve diferença entre os grupos A e B ($p=0,27$). (Figura 8). Sendo assim consideramos que os valores no grupo B foram intermediários, ou seja, maiores que o controle e menores que o grupo A, ao contrário do que já foi descrito na literatura, o nosso trabalho mostra uma tendência a diminuição da insulina com o tratamento com análogos do GnRH.

Ao analisarmos os resultados da insulina e da IGFBP-1 em conjunto, observamos que ambas apresentam uma tendência à diminuição com o tratamento. Esse dado é confirmado pelo fato que ao analisarmos os 3 grupos (controle, A e B) não encontramos a correlação negativa entre insulina e IGFBP-1 já bem conhecida e fundamentada na literatura. E como já foi mencionado anteriormente, essa correlação aparece quando avaliamos somente o grupo controle e grupo A e desaparece quando acrescentamos o grupo B na análise. Esses achados sugerem que exista uma outra regulação negativa da IGFBP-1, e não a insulina, nos casos de meninas com puberdade precoce central durante o tratamento com análogos do GnRH.

Ao analisarmos todos os nossos resultados em conjunto sugerimos que o tratamento da puberdade precoce central com análogos do GnRH provoca uma diminuição dos níveis séricos de estradiol, que por sua vez irão bloquear alguma via de sinalização pós receptor do IGF1R com consequente diminuição da bioatividade do IGF-I, aumento da expressão do IGF1R como mecanismo compensatório, aumento da secreção do GH devido falta de feedback negativo hipofisário e esse aumento da secreção do GH explicaria os níveis séricos elevados de IGF-I e IGFBP-3 e os níveis diminuídos de IGFBP-1. (Figura 15)

Alguns autores defendem o uso combinado de hormônio de crescimento e análogos do GnRH para meninas com puberdade precoce central que apresentaram uma queda exagerada da velocidade de crescimento mantendo-se abaixo do percentil 3 para idade cronológica (PUCARELLI et al., 2000, 2003; PASQUINO

et al., 2013). Os achados do nosso estudo não são favoráveis a essa conduta já que demonstramos que as meninas com puberdade precoce central em uso de análogos do GnRH apresentam níveis altos de IGF-I e IGFBP-3, sugerindo portanto que a produção endógena de GH esteja preservada. Alguns estudos que avaliaram essa combinação não encontraram um benefício significativo(JUNG et al., 2014; WANG et al., 2014). O consenso sobre tratamento da puberdade precoce central sugere que essa combinação não deve ser recomendada de rotina pela falta de estudos controlados, randomizados com um grande número de pacientes(CAREL et al., 2009).

De todas as meninas avaliadas com puberdade precoce central, tivemos a oportunidade de avaliar 6 casos antes e durante o tratamento, ou seja, avaliamos prospectivamente a mesma criança. Nenhum dado avaliado dessas meninas separadamente apresentou resultado diferente e os dados em relação a expressão do mRNA do IGF1R se tornaram ainda mais significativos confirmando um aumento da expressão do mRNA do IGF1R no grupo tratado ($p=0,008$). Sendo assim essas 6 meninas reforçam o achado global do nosso estudo.

É importante ressaltar que as alterações observadas não permitem assertivos sobre o que ocorre a nível tecidual, mas na maioria das situações os achados séricos refletem os achados teciduais.

Figura 15: GnRH α provoca um bloqueio da sinalização do IGF1R com consequente diminuição da bioatividade do IGF-I, aumento da expressão do IGF1R, aumento da secreção do GH que leva ao aumento de IGF-I e IGFBP-3 e diminuição de IGFBP-1.

6 CONCLUSÃO

As variações nas concentrações séricas de IGF-I, IGFBP-3 , IGFBP-1 e insulina não explicam a desaceleração da velocidade de crescimento durante o tratamento de meninas com puberdade precoce central com análogos do GnRH.

O aumento da expressão do IGF1R parece refletir uma redução da sinalização intra celular do IGF1R com consequente diminuição da bioatividade do IGF-I em um mecanismo de feedback de alça ultra curta.

REFERÊNCIAS

APPLIED BIOSYSTEMS. High-Capacity cDNA Archive Kit. p. 1–32, 2009.

ARRIGO, T.; DE LUCA, F.; ANTONIAZZI, F.; GALLUZZI, F.; SEGNI, M.; ROSANO, M.; MESSINA, M. F.; LOMBARDO, F. Reduction of baseline body mass index under gonadotropin-suppressive therapy in girls with idiopathic precocious puberty. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 150, n. 4, p. 533–7, abr. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15080784>>. Acesso em: 8 jul. 2015.

BEDOGNI, G.; GIANNONE, G.; MAGHNIE, M.; GIACOMOZZI, C.; DI IORGI, N.; PEDICELLI, S.; PESCHIAROLI, E.; MELIOLI, G.; MURACA, M.; CAPPA, M.; CIANFARANI, S. Serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) reference ranges for chemiluminescence assay in childhood and adolescence. Data from a population of in- and out-patients. **Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society**, v. 22, n. 3-4, p. 134–8, jan. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22583946>>. Acesso em: 25 set. 2015.

BELCHETZ, P. E.; PLANT, T. M.; NAKAI, Y.; KEOGH, E. J.; KNOBIL, E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophthalamic gonadotropin-releasing hormone. **Science (New York, N.Y.)**, v. 202, n. 4368, p. 631–3, 10 nov. 1978. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/100883>>. Acesso em: 20 jun. 2015.

BRITO, V. N.; BATISTA, M. C.; BORGES, M. F.; LATRONICO, A. C.; KOHEK, M. B. F.; THIRONE, A. C. P.; JORGE, B. H.; ARNHOLD, I. J. P.; MENDONÇA, B. B. Diagnostic value of fluorometric assays in the evaluation of precocious puberty. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 1999.

BRITO, V. N.; LATRONICO, A. C.; ARNHOLD, I. J. P.; MENDONÇA, B. B. A single luteinizing hormone determination 2 hours after depot leuprolide is useful for therapy monitoring of gonadotropin-dependent precocious puberty in girls. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 9, p. 4338–4342, 2004.

BULCAO MACEDO, D.; NAHIME BRITO, V.; LATRONICO, A. C. New Causes of Central Precocious Puberty: The Role of Genetic Factors. **Neuroendocrinology**, v. 100, n. 1, p. 1–8, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.karger.com/Article/FullText/366282>>. Acesso em: 13 jul. 2015.

CAREL, J.-C.; EUGSTER, E. A.; ROGOL, A.; GHIZZONI, L.; PALMERT, M. R.; ANTONIAZZI, F.; BERENBAUM, S.; BOURGUIGNON, J.-P.; CHROUSOS, G. P.; COSTE, J.; DEAL, S.; DE VRIES, L.; FOSTER, C.; HEGER, S.; HOLLAND, J.; JAHNUKAINEN, K.; JUUL, A.; KAPLOWITZ, P.; LAHLOU, N.; LEE, M. M.; LEE, P.; MERKE, D. P.; NEELY, E. K.; OOSTDIJK, W.; PHILLIP, M.; ROSENFELD, R. L.; SHULMAN, D.; STYNE, D.; TAUBER, M.; WIT, J. M. Consensus statement on the use of gonadotropin-releasing hormone analogs in children. In: Pediatrics, **Anais...**2009.

COOKMAN, C. J.; BELCHER, S. M. Estrogen Receptor β Upregulates IGF1R Expression and Activity to Inhibit Apoptosis and Increase Growth of Medulloblastoma. **Endocrinology**, v. 156, n. October, p. en20151141, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25885794>>.

CUSTODIO, R. J.; DO CARMO CUSTODIO, V. I.; SCRIDEI, C. A.; SADER MILANI, S. L.; CERVI, M. C.; CUPO, P.; MARTINELLI, C. E. Impact of hypoxia on IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, ALS and IGFBP-1 regulation and on IGF1R gene expression in children. **Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society**, v. 22, n. 5, p. 186–91, out. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096637412000639>>. Acesso em: 24 jun.

2015.

HANNON, T. S.; JANOSKY, J.; ARSLANIAN, S. A. Longitudinal study of physiologic insulin resistance and metabolic changes of puberty. **Pediatric research**, v. 60, n. 6, p. 759–63, dez. 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1203/01.pdr.0000246097.73031.27>>. Acesso em: 3 jul. 2015.

HARRIS, D. A.; VAN VLIET, G.; EGLI, C. A.; GRUMBACH, M. M.; KAPLAN, S. L.; STYNE, D. M.; VAINSEL, M. Somatomedin-C in normal puberty and in true precocious puberty before and after treatment with a potent luteinizing hormone-releasing hormone agonist. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 61, n. 1, p. 152–9, jul. 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3889035>>. Acesso em: 3 jul. 2015.

HEGER, S.; PARTSCH, C. J.; SIPPELL, W. G. Long-term outcome after depot gonadotropin-releasing hormone agonist treatment of central precocious puberty: final height, body proportions, body composition, bone mineral density, and reproductive function. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 84, n. 12, p. 4583–90, dez. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10599723>>. Acesso em: 17 jun. 2015.

HERMAN-GIDDENS, M. E.; SLORA, E. J.; WASSERMAN, R. C.; BOURDON, C. J.; BHAPKAR, M. V.; KOCH, G. G.; HASEMEIER, C. M. Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in office practice: a study from the Pediatric Research in Office Settings network. **Pediatrics**, v. 99, n. 4, p. 505–12, abr. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9093289>>. Acesso em: 8 maio. 2015.

JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine reviews**, v. 16, n. 1, p. 3–34, fev. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7758431>>. Acesso em: 7 jun. 2015.

JUNG, M. K.; SONG, K. C.; KWON, A. R.; CHAE, H. W.; KIM, D. H.; KIM, H.-S. Adult height in girls with central precocious puberty treated with gonadotropin-releasing hormone agonist with or without growth hormone. **Annals of pediatric endocrinology & metabolism**, v. 19, n. 4, p. 214–9, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4316408&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 4 fev. 2016.

JUUL, A. **Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease**. [s.l.: s.n.]v. 13

JUUL, A.; BANG, P.; HERTEL, N. T.; MAIN, K.; DALGAARD, P.; JØRGENSEN, K.; MÜLLER, J.; HALL, K.; SKAKKEBAEK, N. E. Serum insulin-like growth factor-I in 1030 healthy children, adolescents, and adults: relation to age, sex, stage of puberty, testicular size, and body mass index. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 78, n. 3, p. 744–52, mar. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8126152>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

JUUL, A.; DALGAARD, P.; SKAKKEBAEK, N. Serum levels of Insulin-like Growth Factor (IGF)- Binding Protein-3 (IGFBP-3) in healthy infants, children and adolescents: the relation to IGF-1, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, age, sex, body mass index, and pubertal maturation. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 80, p. 2536–2542, 1995.

JUUL, A.; SCHEIKE, T.; NIELSEN, C. T.; KRABBE, S.; MÜLLER, J.; SKAKKEBAEK, N. E. Serum Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) and IGF-Binding Protein 3 Levels Are Increased in Central Precocious Puberty: Effects of Two Different Treatment Regimens with Gonadotropin-Releasing Hormone Agonists, without or in Combination with an Antiandrog. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 80, n. 10, p. 3059–67, 1 out. 1995. Disponível em: <http://press.endocrine.org/doi/10.1210/jcem.80.10.7559897?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed>. Acesso em: 2 jul. 2015.

- KAISER, U. B.; KUOHUNG, W. KiSS-1 and GPR54 as new players in gonadotropin regulation and puberty. **Endocrine**, v. 26, n. 3, p. 277–84, abr. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16034182>>. Acesso em: 17 ago. 2015.
- KANETY, H.; KARASIK, A.; PARIENTE, C.; KAUSCHANSKY, A. Insulin-like growth factor-I and IGF binding protein-3 remain high after GnRH analogue therapy in girls with central precocious puberty. **Clinical endocrinology**, v. 45, n. 1, p. 7–12, jul. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8796132>>. Acesso em: 2 jul. 2015.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>>. Acesso em: 9 jul. 2014.
- MACEDO, D. B.; CUKIER, P.; MENDONÇA, B. B.; LATRONICO, A. C.; BRITO, V. N. [Advances in the etiology, diagnosis and treatment of central precocious puberty]. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 58, n. 2, p. 108–17, mar. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24830587>>. Acesso em: 2 jul. 2015.
- MARSHALL, W. A.; TANNER, J. M. Variations in pattern of pubertal changes in girls. **Archives of disease in childhood**, v. 44, n. 235, p. 291–303, jun. 1969. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2020314&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 28 abr. 2015.
- MARTINELLI JR, C. E.; CUSTÓDIO, R. J.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. **Fisiologia do eixo GH-sistema IGF** **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2008. .
- MIDYETT, L. K.; MOORE, W. V.; JACOBSON, J. D. Are pubertal changes in girls before age 8 benign? **Pediatrics**, v. 111, n. 1, p. 47–51, jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12509553>>. Acesso em: 27 jul. 2015.
- MORAN, A.; JACOBS, D. R.; STEINBERGER, J.; COHEN, P.; HONG, C. P.; PRINEAS, R.; SINAIKO, A. R. **Association between the insulin resistance of puberty and the insulin-like growth factor-I/growth hormone axis** **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 2002. .
- PALMERT, M. R.; MANSFIELD, M. J.; CROWLEY, W. F.; CRIGLER, J. F.; CRAWFORD, J. D.; BOEPPLE, P. A. Is obesity an outcome of gonadotropin-releasing hormone agonist administration? Analysis of growth and body composition in 110 patients with central precocious puberty. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 84, n. 12, p. 4480–8, dez. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10599706>>. Acesso em: 2 jul. 2015.
- PARENT, A. S.; TEILMANN, G.; JUUL, A.; SKAKKEBAEK, N. E.; TOPPARI, J.; BOURGUIGNON, J. P. The Timing of Normal Puberty and the Age Limits of Sexual Precocity: Variations around the World, Secular Trends, and Changes after Migration. **Endocrine Reviews**, v. 24, n. 5, p. 668–693, 2003.
- PASQUINO, A. M.; PUCARELLI, I.; ACCARDO, F.; DEMIRAJ, V.; SEGNI, M.; DI NARDO, R. Long-term observation of 87 girls with idiopathic central precocious puberty treated with gonadotropin-releasing hormone analogs: impact on adult height, body mass index, bone mineral content, and reproductive function. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 93, n. 1, p. 190–5, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17940112>>. Acesso em: 8 jul. 2015.
- PASQUINO, A. M.; PUCARELLI, I.; SEGNI, M.; MATRUNOLA, M.; CERRONE, F. **Adult Height in Girls with Central Precocious Puberty Treated with Gonadotropin-Releasing Hormone Analogues and Growth Hormone** **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** Endocrine Society, , 1 jul. 2013. . Disponível em: <http://press.endocrine.org/doi/10.1210/jcem.84.2.5431?url_ver=Z39.88-

2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed>. Acesso em: 4 fev. 2016.

PELTEK KENDIRCI, H. N.; AĞLADIOĞLU, S. Y.; ÖNDER, A.; BAŞ, V. N.; ÇETINKAYA, S.; AYCAN, Z. Effects of GnRH analogue treatment on anterior pituitary hormones in children with central precocious puberty. **Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM**, 22 maio 2015. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/jpem.ahead-of-print/jpem-2014-0222/jpem-2014-0222.xml>>. Acesso em: 3 jul. 2015.

PERRY, R. J.; FARQUHARSON, C.; AHMED, S. F. The role of sex steroids in controlling pubertal growth. **Clinical endocrinology**, v. 68, n. 1, p. 4–15, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17645565>>. Acesso em: 19 jan. 2016.

PUCARELLI, I.; SEGNI, M.; ORTORE, M.; ARCADI, E.; PASQUINO, A. M. Effects of combined gonadotropin-releasing hormone agonist and growth hormone therapy on adult height in precocious puberty: a further contribution. **Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM**, v. 16, n. 7, p. 1005–10, set. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14513877>>. Acesso em: 4 fev. 2016.

PUCARELLI, I.; SEGNI, M.; ORTORE, M.; MORETTI, A.; IANNACCONE, R.; PASQUINO, A. M. Combined therapy with GnRH analog plus growth hormone in central precocious puberty. **Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM**, v. 13 Suppl 1, p. 811–20, jul. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10969926>>. Acesso em: 4 fev. 2016.

RICCO, R. C. **Avaliação da expressão do receptor tipo 1 dos fatores de crescimento insulina símile (igf1r) em crianças obesas altas**. 2014. FMRP-USP, 2014.

RINDERKNECHT, E.; HUMBEL, R. E. Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities: evidence for structural homology with insulin B chain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 12, p. 4379–4381, 1976.

SADER MILANI, S. L. **Caracterização clínica e laboratorial de crianças e adolescentes com insensibilidade parcial ao hormônio de crescimento ou ao igf-i**. 2009. 2009.

SALES, D. S.; MOREIRA, A. C.; CAMACHO-HÜBNER, C.; RICCO, R. G.; DANELUZZI, J. C.; CAMPOS, A. D.; MARTINELLI, C. E. Serum insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3 in girls with premature thelarche. **Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM**, v. 16, n. 6, p. 827–33, jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12948294>>. Acesso em: 3 jul. 2015.

SALMON, W. D.; DAUGHADAY, W. H. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 49, n. 6, p. 825–36, jun. 1957. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13429201>>. Acesso em: 17 ago. 2015.

SARFSTEIN, R.; WERNER, H. Minireview: Nuclear insulin and insulin-like growth factor-1 receptors: A novel paradigm in signal transduction. **Endocrinology**, v. 154, n. 5, p. 1672–1679, 2013.

SCRIDELI CA, T. L. Técnicas de biologia molecular em doenças onco-hematológicas da infância. In: **Hematologia para o Pediatra**. [s.l.: s.n.]p. 457–71.

SONG, H. S.; CHOI, W. B.; SONG, J. S.; HWANG, I. T.; YANG, S. Relationship between serum insulin-like growth factor-1, IGF binding protein-3 levels and body height before and after gonadotropin-releasing hormone agonist therapy. **Annals of pediatric endocrinology & metabolism**, v. 19, n. 4, p. 208–13, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4316410&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 jul. 2015.

SØRENSEN, K.; MOURITSEN, A.; MOGENSEN, S. S.; AKSGLAEDE, L.; JUUL, A. Insulin

sensitivity and lipid profiles in girls with central precocious puberty before and during gonadal suppression. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 2010.

SORIANO-GUILLÉN, L.; CORRIPIO, R.; LABARTA, J. I.; CAÑETE, R.; CASTRO-FEIJÓO, L.; ESPINO, R.; ARGENTE, J. Central precocious puberty in children living in Spain: incidence, prevalence, and influence of adoption and immigration. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 95, n. 9, p. 4305–13, set. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20554707>>. Acesso em: 30 jul. 2015.

TEILMANN, G.; PEDERSEN, C. B.; JENSEN, T. K.; SKAKKEBAEK, N. E.; JUUL, A. Prevalence and incidence of precocious pubertal development in Denmark: an epidemiologic study based on national registries. **Pediatrics**, v. 116, n. 6, p. 1323–8, dez. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16322154>>. Acesso em: 30 jul. 2015.

WANG, C.-L.; LIANG, L.; LIU, P.-N.; JIN, X.-J.; CHEN, L.-Q.; YANG, F.; LIAN, Q.; CHEN, R.-M. [Effects of gonadotropin releasing hormone analog and growth hormone on height in girls with idiopathic central precocious puberty]. **Zhongguo dang dai er ke za zhi = Chinese journal of contemporary pediatrics**, v. 16, n. 1, p. 25–30, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24461173>>. Acesso em: 4 fev. 2016.

WENNINK, J. M.; DELEMARRE-VAN DE WAAL, H. A.; SCHOEMAKER, R.; BLAAUW, G.; VAN DEN BRAKEN, C.; SCHOEMAKER, J. Growth hormone secretion patterns in relation to LH and estradiol secretion throughout normal female puberty. **Acta endocrinologica**, v. 124, n. 2, p. 129–35, fev. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2003372>>. Acesso em: 2 jul. 2015.

WERNER, H.; SARFSTEIN, R. Transcriptional and epigenetic control of IGF1R gene expression: Implications in metabolism and cancer. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 24, n. 4, p. 112–118, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ghir.2014.03.006>>.

YU, H.; MISTRY, J.; NICAR, M. J.; KHOSRAVI, M. J.; DIAMANDIS, A.; VAN DOORN, J.; JUUL, A. Insulin-like growth factors (IGF-I, free IGF-I and IGF-II) and insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-6, and ALS) in blood circulation. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 13, n. 4, p. 166–72, jan. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10414596>>. Acesso em: 2 jul. 2015.

8 ANEXOS

ANEXO 1

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE ESCLARECIMENTO E CONSENTIMENTO

Sabe-se que as crianças portadoras de puberdade precoce apresentam aceleração do crescimento, que diminui com o tratamento com análogo do GnRH. As causas exatas dessa desaceleração do crescimento ainda não estão totalmente identificadas, uma vez que não se observa alteração nítida dos hormônios que promovem o crescimento, ou seja, do hormônio de crescimento (GH) e do IGF-I. Além disso também discute-se se o perfil metabólico das crianças com puberdade precoce seja desfavorável.

Neste sentido nós propomos uma pesquisa que irá avaliar o crescimento e o perfil metabólico da criança antes e durante o tratamento com diferentes doses da medicação. Esta avaliação constitui-se por medidas de altura e peso, dentre outras, e análise no sangue de diversos hormônios relacionados ao crescimento e ao perfil metabólico. Esta análise será realizada em 3 momentos (diagnóstico e 2x durante o tratamento)

É extremamente importante lembrar que todas as avaliações de altura serão realizadas nos dias de consulta já agendadas pela equipe da endocrinologia e as coletas de sangue ocorrerão no mesmo dia da coleta dos exames para controle laboratorial do tratamento.

Vale a pena ressaltar que as informações são sigilosas e os resultados serão divulgados ao final do trabalho apenas aos responsáveis, caso desejarem. É garantido ao paciente o direito de: receber resposta a qualquer pergunta sobre os procedimentos, riscos e benefícios da pesquisa da qual participará; deixar de participar do estudo a qualquer momento sem que isso o prejudique de qualquer forma; não ser identificado e que todas as informações a seu respeito sejam

confidenciais; receber informações atualizadas durante o estudo, mesmo que com isso o paciente desista da participação; receber tratamento médico, por parte da Instituição de saúde, se sofrer qualquer tipo de dano DIRETAMENTE relacionado a pesquisa; ser ressarcido por gastos relativos a transporte e alimentação relacionados a pesquisa.

É importante ressaltar que a participação de crianças voluntárias não portadoras de doenças endócrinas irá contribuir de forma muito importante na interpretação destas informações.

Os pesquisadores envolvidos poderão ser contactados a qualquer momento durante o desenvolvimento da pesquisa pelo telefone:

Dra. Mariana Teresa Alves Sarti de Paula (16) 99925207

Prof. Dr. Carlos Eduardo Martinelli Jr. (16) 3602-2672

Eu, _____ abaixo assinado e responsável pelo paciente _____ após receber informações sobre o projeto de pesquisa: “Avaliação do crescimento, dos parâmetros metabólicos e da expressão do receptor tipo 1 dos IGFs (IGF1R) durante tratamento de puberdade precoce central.” que será realizado pela Dra. Mariana Teresa Alves Sarti de Paula sob orientação do professor Dr. Carlos Eduardo Martinelli Jr., sabendo de meus direitos, concordo com o escrito acima, e permito que a criança acima identificada participe como voluntária do estudo.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20 ____

assinatura do participante

assinatura do responsável pelo participante

ANEXO 2

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

www.hcrp.usp.br

Ribeirão Preto, 14 de setembro de 2011

Ofício nº 3335/2011
CEP/RCC

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO, DOS PARÂMETROS METABÓLICOS E DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR TIPO 1 DOS IGFs (IGF 1R) DURANTE TRATAMENTO DE PUBERDADE PRECOCE CENTRAL”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 332ª Reunião Ordinária realizada em 12/09/2011, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 5874/2011.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Atenciosamente.

PROF. DR. RICARDO DE CARVALHO CAVALLI

Vice-Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

MARIANA TERESA ALVES SARTI DE PAULA

PROF. DR. CARLOS EDUARDO MAETINELLI JÚNIOR

Depto. de Puericultura e Pediatria

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP- Campus Universitário

FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4

Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br

Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ANEXO 3

Representação gráfica da regulação bifásica da expressão do IGF1R encontrada nos trabalhos do nosso grupo. Os controles estão representados nos valores de Y entre 1 e 2. Abaixo de 1 estão representados os pacinetes com bioatividade do IGF-I diminuída (crianças com hipóxia, com baixa estatura por resistência ao GH/IGF, e em tratamento para puberdade precoce central). Acima de 2 estão representados os pacientes com bioatividade do IGF-I aumentada (crianças com obesidade primária).

ANEXO 4

Tabelas com os dados dos pacientes

Paciente Grupo A	idade	IGF I ng/ml	IGF ajustado	BP3 Ug/ ml	BP1	Insulina uUI/ml	Relação	IFG1R	VC	LH basal	LHRH
8	8,25	457	1,48	3,46	4,97	8,0	0,497	2,4752 5239		4,2	
9	7,5	297	0,74	3,97	12,5 8	5,0	0,281	0,8693 91501	7		18,2
11	7,6	473	1,57	4,83	6,08	10,0	0,368	1,4732 7745	8		14,2
13	8,5	443	1,40	5,92	8,48		0,281	1,1799 49522	8		6,9
26	8,4	353	0,91	4,35	21,4 6	10,0	0,305	1,3383 57925	8,5	8,6	
29	7,6	424	1,30	6,01	1,97	13,5	0,265	0,9611 54103	6	2,5	19,5
32	8,8	322	0,40	4,51	6,59	4,0	0,268	1,3045 88675	11		15,7
34	6,4	458	2,27	5,64	15,9 0	16	0,305	1,2747 09225	9		44
40	8,5	365	0,98	6,99	10,8 1	8,3	0,196	1,1764 25338	7,5		16,6
41	8,6	273	0,10	4,91	6,00	13,0	0,209	1,4345 74366	12		10,7
42	8,8	321	0,40	3,78	3,47	15,0	0,319	1,4408 52046			21
44	8,1	381	1,07	5,98	2,61	2,0	0,239	0,8646 82972	10	1,9	
46	8,1	305	0,65	4,25	17,3 9	7,5	0,27	1,9857 29814	9		14,2
56	7,8	408	1,21	4,40	-	21,0	0,349	0,9734 94053	12		7,3
58	8,9	488	1,13	5,47	26,0 7	6,0	0,336	2,5406 94475		1,2	
66	8,6	587	1,56	5,79	7,42	2,8	0,381	5,6474 90978	12		3,2

Paciente Grupo B	IDADE	IGF I ng/ml	IGF ajusta do	BP3 Ug/ml	BP1	Insulina uUI/ml	Relação	IFG1R	VC	LH POS	Tempo TTO - meses	Tipo de TTO
2	8,25	529	1,87	6,12	10,45		0,325	1,0508 24165	7	3,3	5	M
10	7,9	287	0,55	3,99	13,48	12,0	0,27	0,7182 64818	7,2	2,6	36	M
25	9,5	595	1,59	6,42	2,09		0,349	1,5212 64315	6	2,6	15	T
59	9	494	1,15	3,25	0,32	10,5	0,572	1,8685 15611	5	6,4	7	M
60	9,3	282	0,23	4,84	-	32,0	0,219	2,4890 95211	7,2	2	6	M
61	9,5	536	1,34	5,73	4,93	4,5	0,352	1,1185 95004	3	3,3	9	T
64	8,9	458	1,00	6,26	4,38	10,5	0,275	8,9644 32716	6,7	1,5	7	M
65	10,1	448	0,86	5,44	2,41		0,31	9,7464 8571		3,8	22	M
68	9,3	545	1,37	6,03	2,29	5,0	0,34	13,292 38224	4,8	6,0	10	M
69	9,8	369	0,53	6,30	19,33	2,0	0,22	2,3350 16251	3,6	2,6	10	M
70	9,6	398	0,65	4,62	128,5 3		0,324	6,1736 73153	5,3	4,4	5	M
71	10,7	317	0,32	5,16	1,70	6,0	0,231	13,913 90705	7	0,6	8	T
73	10,3	437	0,82	5,84	0,40	7,0	0,281	20,639 55688	3	2,3	11	T
74	7,7	373	1,02	5,75	2,61	10,0	0,244	15,758 23975	5	3,6	13	M
77	9,2	381	0,66	5,22	4,58	2,0	0,274	0,8263 41271	5	2,6	8	T
78	10,6	368	0,53	4,74	6,79		0,292	1,5872 15662	6	5,3	11	T

Pacientes	Idade	Sexo	IGF I	IGF-I ajustado	BP3	BP1	INSULINA	RELAÇÃO	IGF1R
Grupo Controle									
RCR 7	5,5	F	134	0,07	2,81	69,52	6,1	0,179	0,459
RCR 8	5,9	M	128	0,19	3,52	92,86	2,0	0,136	1,72
RCR 12	6,1	F	242	0,72	4,26	41,30	10,0	0,213	0,56
RCR 13	7,3	M	160	0,10	3,94	58,80	2,0	0,152	1,00
RCR 14	8,5	F	101	-0,45	2,65	33,49	9,0	0,143	0,34
RCR 16	8,0	M	122	-0,21	3,92	27,73	5,5	0,117	1,17
RCR 20	6,2	F	146	0,04	3,54	48,04	2,7	0,155	1,01
RCR 21	8,8	F	185	-0,19	3,83	21,79	3,0	0,181	1,13
RCR 23	6,5	F	141	0,007	3,97		4,0	0,133	1,29
RCR 24	8,8	F	117	-0,48	2,4	38,45	3,0	0,183	2,59
RCR 25	5,0	M	123	0,5	3,18	19,29	3,2	0,145	1,95
RCR 26	6,5	M	359	2,35	4,58	18,81	4,0	0,295	1,73
RCR 28	6,7	M	122	-0,15	4,01	79,59	2,2	0,114	0,72
RCR 29	6,8	F	187	0,1	4,16	28,32	2,6	0,169	2,25
RCR 30	9,5	M	398	1,15	4,55	0,63	10,0	0,329	0,67
RCR32	9,4	M	100	-0,45	2,88		2,0	0,13	1,46
RCR 36	6,5	M	160	0,49	4,27		5,0	0,141	1,23
RCR 39	6,6	F	202	0,44	4,67		5,0	0,162	0,83

9 ARTIGO

Expressão do receptor tipo 1 do IGF-I (IGF1R) em meninas com puberdade precoce central.

Mariana T. A Sarti de Paula¹, Rafaela Ricco¹, Rodrigo J. Custodio¹, Soraya S. Milani¹, Patrícia V.S. Atique¹, Ayrton C. Moreira², Sonir R.R. Antonini¹, Raphael Del Roio Liberatore Jr.¹, Carlos E. Martinelli Jr.¹

Departamentos de Puericultura e Pediatria¹ e de Clínica Médica², faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

RESUMO

Na puberdade, tanto fisiológica quanto precoce, um dos eventos marcantes é o estirão de crescimento. Observa-se um aumento da liberação do GH, IGF-I e IGFBP-3 no período puberal porém durante o tratamento da puberdade precoce, apesar do bloqueio do eixo gonadal e da diminuição da velocidade de crescimento, os níveis séricos de IGF-I e IGFBP-3 mantêm-se elevados. A IGFBP-1 diminui com a puberdade porém não existem relatos do seu comportamento durante o tratamento da puberdade precoce. Também não existem relatos sobre a expressão do IGF1R durante a puberdade. Considerando que estes poderiam ser pontos de regulação da velocidade de crescimento durante o tratamento da puberdade precoce, o presente estudo propõe avaliar a expressão do gene do IGF1R mRNA e os níveis de IGFBP1 em meninas com puberdade precoce central antes e durante o tratamento com análogos do GnRH. Avaliamos 16 meninas com puberdade precoce central antes do início do tratamento, 16 em tratamento regular e 18 crianças saudáveis, pré-púberes como grupo controle. Os resultados foram níveis séricos de IGF-I e IGFBP3 significativamente maiores nas crianças púberes e não encontramos diferença entre o grupo sem e com tratamento. Os níveis séricos de IGFBP1 foram maiores nas crianças pré-púberes e uma tendência a valores menores no grupo tratado. O grupo em tratamento apresentou uma hiperexpressão significativa do gene do IGF1R. CONCLUSÃO: As variações nas concentrações séricas de IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-1 não explicam a desaceleração da velocidade de crescimento durante o tratamento da puberdade precoce central. O aumento da expressão do IGF1R parece refletir uma redução da sinalização intra-celular do IGF1R com consequente diminuição da bioatividade do IGF-I em um mecanismo de feedback de alça ultra curta.

1. INTRODUÇÃO

A puberdade é o período de transição entre a infância e a idade adulta, durante o qual os caracteres sexuais secundários aparecem e o estirão puberal ocorre. O eixo GH-IGF (hormônio de crescimento – fatores de crescimento insulina-símile ou *insulin-like growth factors*) constitui a via final responsável pelo crescimento. Durante a puberdade, ocorre um aumento da liberação do GH, do estágio pré-puberal até a menarca, com uma diminuição pós menarca. Este aumento acompanha-se de elevação das concentrações séricas de IGF-I e IGFBP-3 e uma diminuição dos níveis séricos de IGFBP-1. (WENNINK et al., 1991; JUUL; DALGAARD; SKAKKEBAEK, 1995; YU et al., 1999; MARTINELLI JR; CUSTÓDIO; AGUIAR-OLIVEIRA, 2008). Esses achados em relação ao eixo GH-IGF na puberdade são condizentes com a clínica de aumento da velocidade de crescimento que ocorre no período puberal.

Em meninas, a puberdade é considerada precoce quando iniciada antes dos 8 anos de idade. Pode ser secundária a uma ativação precoce do eixo gonadal (puberdade precoce central, PPC) ou secundária a produção de esteroides sexuais independente de gonadotrofinas (puberdade precoce periférica). Assim como na puberdade fisiológica, a aceleração do crescimento é um evento marcante da puberdade precoce. Em meninas com PPC, a instituição do tratamento com análogos de

GnRH normaliza a velocidade de crescimento (MACEDO et al., 2014). Crianças com puberdade precoce central apresentam níveis séricos de IGF-I e IGFBP-3 mais altos que crianças pré púberes pareadas por idade. Esses achados são compatíveis com a clínica já que essas crianças apresentam aumento da velocidade de crescimento. Com o tratamento com análogos do GnRH essas crianças apresentam bloqueio do eixo gonadal e diminuição da velocidade de crescimento, porém mantém níveis séricos elevados de IGF-I e IGFBP-3, contrapondo-se a observação de redução da velocidade de crescimento (JUUL et al., 1995). Não existem relatos sobre o comportamento da IGFBP-1 durante o tratamento da puberdade precoce.

Os IGFs exercem suas ações mediante dois tipos de receptores: o receptor de IGF tipo 1 (IGF1R) e o receptor de IGF tipo 2 (IGF2R). A maioria das ações conhecidas dos IGFs ocorre através do IGF1R, presente na maioria dos tecidos do organismo, e cuja regulação tem sido tema de estudos recentes (JONES; CLEMMONS, 1995; SARFSTEIN; WERNER, 2013; WERNER; SARFSTEIN, 2014).

Não existem relatos sobre a expressão do IGF1R mRNA durante a puberdade ou estudos sobre sua expressão em crianças com puberdade precoce central.

Considerando que estes poderiam ser pontos de regulação da velocidade de crescimento durante o tratamento da puberdade precoce, o presente estudo propõe avaliar a expressão do gene do

IGF1R mRNA e os níveis de IGFBP1 em meninas com puberdade precoce central antes e durante o tratamento com análogos do GnRH.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Casuística

O grupo de pacientes do estudo foi formado por uma amostra de conveniência de meninas com PPC atendidas no Ambulatório de Endocrinologia Infantil do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP). Foram estudadas 26 meninas com o diagnóstico de PPC e idade entre 6,3 e 10,8 anos, ($8,7 \pm 1,05$). O diagnóstico de PPC foi realizado mediante avaliação clínica (aparecimento dos caracteres sexuais secundários antes dos 8 anos) e laboratorial (LH basal maior que 0,6 mU/ml ou pico de LH maior que 6,9 mU/ml após estímulo com 100µg de GnRH endovenoso) (BRITO et al., 1999).

Dezoito 18 crianças saudáveis pré-púberes com idade entre 5,1 e 9,5 anos, ($7,1 \pm 1,3$ anos) constituíram o grupo controle. Foram excluídas crianças portadoras de doenças crônicas, doenças genéticas, nutricionais ou outras alterações hormonais além da PPC ou que, no momento da coleta, apresentassem qualquer sinal de afecção aguda.

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e da Faculdade de

Medicina de Ribeirão Preto. Processo HCRP Nº 5874/2011.

2.2. Desenho experimental

As 26 pacientes com PPC foram divididas em dois grupos. O Grupo A foi constituído por 16 meninas avaliadas antes do início do tratamento e o Grupo B constituído por 16 meninas em uso regular de análogo do GnRH. Foram incluídas no grupo B apenas pacientes que apresentavam sinais clínicos de bloqueio puberal (diminuição da velocidade de crescimento e não progressão dos caracteres sexuais secundários) ou dosagem de LH < 6,6 em amostra coletada 2 horas após aplicação da medicação (BRITO et al., 2004). Seis pacientes participaram do estudo em dois momentos, no diagnóstico de PPC e depois em uso do análogo do GnRH as demais pacientes participaram do estudo somente em um momento.

De todos participantes, incluindo o grupo controle, foi coletado sangue para dosagem de IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-1, insulina e análise da expressão do mRNA do IGF1R em linfócitos periféricos. As amostras coletadas foram imediatamente processadas para extração do mRNA que foi mantido a -70°C até o momento de análise. Os soros foram congelados a -20°C até o momento da dosagem.

Por ocasião da coleta foi aferido peso, estatura, velocidade de crescimento, índice de massa corpórea (IMC) e o estágio puberal (MARSHALL; TANNER, 1969) em todos participantes. (Tabela 1)

2.3. Imunoensaios

A dosagem do IGF-I foi realizada por ensaio imunométrico de fase sólida revelado por quimiluminescência (IMMULITE 2000, SIEMENS). A sensibilidade analítica foi de 20ng/ml. O coeficiente de variação interensaio foi de 6,04% e o coeficiente de variação intraensaio foi de 2,4%. Os resultados foram expressos em ng/ml.

A dosagem da IGFBP-3 foi realizada por ensaio imunométrico de fase sólida revelado por quimiluminescência (IMMULITE 2000, SIEMENS). A sensibilidade analítica foi de 0,1mg/L. O coeficiente de variação interensaio foi de 3,42% e o coeficiente de variação intraensaio foi de 2,3%.

A dosagem quantitativa de IGFBP-1 foi realizada utilizando método ELISA (Kit RayBio Human IGF-BP-1). A sensibilidade analítica foi de 5 ng/ml. O coeficiente de variação intraensaio foi 3,3%. Todas as amostras foram dosadas no mesmo ensaio.

A dosagem de insulina foi realizada utilizando ensaio imunoradiométrico (IRMA). A sensibilidade analítica foi de 0,5Uui/ML. O coeficiente de variação intraensaio foi de 6,6%. Todas as amostras foram dosadas no mesmo ensaio.

A dosagem do hormônio luteinizante (LH) foi realizada utilizando ensaio fluorimétrico de fase sólida (AutoDELFIA).

O coeficiente de variação interensaio foi de 5.2%.

2.4. Expressão do mRNA do IGF1R

A avaliação da expressão do IGF1R foi realizada no Laboratório de Pediatria – Biologia Molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Essa avaliação foi feita através da extração do mRNA de linfócitos do sangue periférico após separação pela técnica do TRISOL. O mRNA extraído foi convertido a cDNA pela técnica de transcrição reversa usando o Kit High Capacity da Applied e quantificado mediante emprego de sondas específicas (TaqMan®) por técnica de PCR em tempo real (PCR quantitativo). A análise do gene IGF1R foi feita em duplicata e como referência endógena foram utilizados os genes da $\beta 2$ microglobulina e da β -glucoronidase (GUS β). Como normatizador foi utilizada amostra de paciente pré púbere controle (SCRIDELI CA, 2007; CUSTODIO et al., 2012; RICCO, 2014).

2.5. Análise Estatística

Os valores das variáveis sem distribuição normal estão descritos através de medianas e intervalos interquartis e das variáveis com distribuição normal estão descritos como médias e desvios-padrão. A comparação entre 2 grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, e pelo teste *t-student*. Para comparação entre os 3 grupos foi utilizado Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de

Dunn. Para o estudo das correlações foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Valores de estatura, peso e IMC foram ajustados para idade e sexo calculando-se o escore do desvio padrão (EDP) para sexo e idade cronológica com auxílio do software WHO AnthroPlus. Valores de IGF-I foram ajustados para idade e sexo da seguinte maneira: subtraindo do valor obtido o valor correspondente ao percentil 50 para sexo e idade e após dividindo pelo valor no percentil 50, (valor - p50 / p50) (BEDOGNI et al.,). Para as análises pareadas foi realizado o teste de Wilcoxon. Para avaliar expressão relativa do gene do IGF1R foi utilizado o método do $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Arbitrariamente foram consideradas como tendo expressão aumentada as amostras que exibirem valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ superiores a 2. Na análise além do teste de Kruskal-Wallis foi também utilizado o Teste de Fisher. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa de análise estatística GraphPadPrism. Foi considerado como estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. IGF1R (mRNA)

A expressão relativa do gene IGF1R ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi maior no grupo B quando comparado com o grupo A ($p=0,04$) e também foi maior quando comparado ao grupo controle ($p=0,004$). Quando consideramos

valores de $2^{-\Delta\Delta CT} \geq 2$ como aumentados observamos que no Grupo B 9 de 16 pacientes apresentam expressão aumentada do mRNA do IGF1R enquanto no Grupo controle apenas 2 de 18 ($p=0,009$). Comparando o Grupo B e o Grupo A, onde apenas 3 de 16 apresentam valores aumentados, a diferença foi marginal com valor de $p=0,06$. Não foi observada diferença entre grupo controle e grupo A. (Figura 1)

3.2. IGF-I e IGF-I ajustado

As concentrações séricas o IGF-I foram estatisticamente maiores no Grupo A e Grupo B em relação ao controle. Não houve diferença estatística entre os grupos A e B ($p < 0,0001$) (Figura 2).

Os valores do IGF-I ajustado foram estatisticamente maiores no Grupo A e Grupo B em relação ao controle. Não houve diferença estatística entre os grupos A e B ($p < 0,0001$).

3.3. IGFBP-3

As concentrações séricas de IGFBP-3 foram estatisticamente maiores nos grupos A e B em relação ao controle. Não houve diferença estatística entre os grupos A e B ($p < 0,0001$) (Figura 2).

3.4. Relação molar IGF-I/IGFBP3

A relação molar entre IGF-I e IGFBP-3 foi significativamente menor no grupo controle quando comparada com as crianças púberes dos dois grupos tanto sem quanto

com tratamento ($p < 0,0001$). Porém não encontramos diferença estatística entre os grupos A e B.

3.5. IGFBP-1

As concentrações séricas de IGFBP-1 foram significativamente maiores no grupo controle quando comparado aos grupos A e B e não houve diferença estatística entre os grupos A e B ($p < 0,0001$) (Figura 3).

3.6. Insulina

As concentrações séricas de insulina foram significativamente menores no grupo controle quando comparado ao grupo A e não houve diferença quando comparado ao grupo B. Também não houve diferença entre os grupos A e B ($P < 0,010$) (Figura 4).

3.7. Análise das pacientes avaliadas antes e após tratamento.

Não encontramos diferença significativa nos níveis de IGF-I, IGFBP3 ou na relação molar (respectivamente $p = 1,000$; $p = 0,81$; $p = 0,93$). Entretanto quando avaliamos a expressão do mRNA do IGF1R encontramos diferença significativa com expressão maior durante o tratamento ($p = 0,008$).

4. DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos de forma original que a expressão do mRNA do IGF1R aumenta significativamente em meninas com puberdade precoce central em

tratamento com análogo do GnRH. Este achado acompanhou-se de desaceleração significativa da velocidade de crescimento, porém com manutenção das concentrações elevadas de IGF-I e IGFBP-3. Como verificamos uma diminuição da velocidade de crescimento com altas concentrações de IGF-1 e IGFBP-3 acreditamos que exista uma diminuição da bioatividade do IGF-I. Como a expressão do mRNA do receptor de IGF-I apresentou-se elevada, acreditamos que esse bloqueio da ação do IGF-I seja pós receptor e essa resposta do receptor funcione como um mecanismo compensatório a uma diminuição de atividade do eixo GH-IGF, determinada em outro nível e não no próprio receptor.

Esse aumento da expressão do mRNA do IGF1R em situações de diminuição da bioatividade do IGF já foi observado pelo nosso grupo em outras populações como pacientes com hipóxia e pacientes com baixa estatura idiopática com dados laboratoriais sugestivos de resistência ao GH/IGF (SADER MILANI, 2009; CUSTODIO et al., 2012). Entretanto o nosso grupo também já observou aumento da expressão do mRNA do IGF1R em situações de aumento da bioatividade do IGF, por exemplo, em crianças com obesidade primária e aumento da velocidade de crescimento (RICCO, 2014).

Sendo assim sugerimos que o receptor tipo 1 do IGF pode apresentar uma regulação bifásica com a expressão aumentada nos dois extremos de

bioatividade do IGF-I formando uma curva em U.

Não há estudos sobre a expressão fisiológica do IGF1R ao longo da vida para correlacionar a expressão com a idade, o sexo e o estadiamento puberal. Esse estudo demonstra pela primeira vez que não ocorre mudança significativa na expressão do IGF1R com o início da puberdade. Porém temos um pequeno número de casos e são necessários mais estudos para confirmar esse achado.

Nesse estudo encontramos, níveis séricos de IGF-I e IGFBP-3 significativamente maiores em crianças com puberdade precoce quando comparadas com crianças pré-púberes. Esses resultados são concordantes com a clínica, pois durante a puberdade precoce ocorre além do aparecimento dos caracteres sexuais secundários, o estirão de crescimento e sabemos que o eixo GH-IGF constitui a via final mediante a qual a maioria dos fatores que atuam no processo de crescimento exerce sua ação. Outros autores já demonstraram que durante a puberdade tanto fisiológica quanto precoce, ocorre um aumento da liberação do GH em meninas e que as concentrações séricas tanto do IGF-I quanto da IGFBP-3 atingem os maiores valores durante a puberdade (WENNINK et al., 1991; JUUL et al., 1994; JUUL; DALGAARD; SKAKKEBAEK, 1995; SALES et al., 2003).

O grupo controle foi composto por crianças do sexo masculino e feminino

enquanto os casos foram somente do sexo feminino. Esse fato ocorreu devido a dificuldade de se obter um grupo controle composto por crianças saudáveis e aceitamos a inclusão de crianças do sexo masculino no grupo controle pois já é conhecido que o eixo GH/IGF apresenta maior diferença entre os sexos na época da puberdade e o grupo controle foi composto por crianças pré-púberes (JUUL et al., 1994). Para neutralizar essa limitação realizamos o IGF-I ajustado para sexo e idade (valor do paciente – valor p50 para sexo e idade / valor no p50 para sexo e idade) (BEDOGNI et al.,). O resultado da análise estatística do IGF-I corrigido para sexo e idade foi muito semelhante aos resultados do IGF-I e não modificou a conclusão dos dados.

Observamos também que esse aumento do IGF-I e da IGFBP-3 na puberdade precoce não é linear apresentando um aumento maior do IGF-I em relação a IGFBP-3 o que pode ser demonstrado pelo aumento da relação molar entre IGF-I/IGFBP-3. Outros autores já demonstram esse aumento da relação molar tanto na puberdade fisiológica quanto na precoce e defendem a hipótese de que, com aumento da relação molar, o IGF-I bioativo circulante estará aumentado e isso explicaria o estirão de crescimento que ocorre durante a puberdade (JUUL et al., 1995; SALES et al., 2003).

Verificamos também que os níveis séricos da IGFBP-1 diminuem com o início da puberdade precoce. Outros autores já

descreveram que os níveis séricos da IGFBP-1 caem na época da puberdade fisiológica(JUUL; DALGAARD; SKAKKEBAEK, 1995). Não há relatos na literatura sobre os níveis da IGFBP-1 em meninas com puberdade precoce central.

Avaliamos também os níveis séricos de insulina os quais apresentaram um aumento significativo com o início da puberdade precoce. Diversos autores já descreveram uma resistência insulínica com o início da puberdade, seja ela fisiológica ou precoce. Estudos sugerem que as alterações no eixo GH/IGF durante a puberdade podem contribuir para essa resistência insulínica (MORAN et al., 2002; HANNON; JANOSKY; ARSLANIAN, 2006). Em meninas com puberdade precoce central, também já foi descrito a presença de resistência insulínica e quando comparadas com controles pareados para o estadiamento puberal, os casos de puberdade precoce apresentaram uma produção ainda maior de insulina, sugerindo um perfil metabólico desfavorável nessas pacientes (SØRENSEN et al., 2010). Ao avaliarmos os pacientes do grupo controle e do grupo A, ou seja, somente os indivíduos que não estavam recebendo medicação, observamos uma correlação negativa ($r = -0,5$; $p = 0,007$) entre as concentrações de IGFBP-1 e as de insulina.

Crianças com puberdade precoce central apresentam um estirão de crescimento em idade mais precoce e quando iniciamos o tratamento com análogos do

GnRH, essas crianças apresentam além do bloqueio do eixo gonadal uma diminuição significativa da velocidade de crescimento, sendo assim, nosso estudo também comparou as concentrações séricas de IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-1 e a expressão do mRNA do IGF1R em meninas com puberdade precoce, antes e durante o tratamento com análogos do GnRH.

A velocidade de crescimento apresentou uma queda estatisticamente significativa passando de uma média de 9,1cm/ano no grupo A para 5,4 cm/ano no grupo B ($p = 0,0005$), entretanto, os níveis séricos de IGF-I, IGFBP-3 assim como a relação molar entre IGF-I/IGFBP-3 não apresentaram diferença significativa quando comparamos o grupo com e sem tratamento. Sendo assim, demonstramos que a queda da velocidade de crescimento induzida pelo análogo do GnRH nas pacientes com puberdade precoce não é secundária a uma queda nos níveis séricos de IGF-I ou IGFBP-3. Diversos autores já descrevem que não há uma diminuição dos níveis séricos de IGF-I com o tratamento com análogos do GnRH apesar de uma significativa queda na velocidade de crescimento(JUUL et al., 1995; KANETY et al., 1996; SONG et al., 2014; PELTEK KENDIRCI et al., 2015). Dados na literatura sobre o comportamento da IGFBP-3 durante o uso de análogos do GnRH são mais controversos. Alguns autores, assim como o presente estudo, não observaram diferença significativa nos níveis séricos de IGFBP-3

com uso de análogos do GnRH(KANETY et al., 1996; SONG et al., 2014). Outros autores descrevem uma diminuição do IGFBP-3 corrigido para o desvio padrão de idade e sexo(PELTEK KENDIRCI et al., 2015). Há ainda autores que descrevem um aumento significativo dos níveis de IGFBP-3 com uso de análogos do GnRH(JUUL et al., 1995).(JUUL et al., 1995)

Os níveis séricos de IGFBP-1 não apresentaram diferença estatística entre os grupos com e sem tratamento. Não há na literatura dados sobre o comportamento da IGFBP-1 durante o tratamento com análogos do GnRH. Porém quando consideramos as concentrações de IGFBP-1 ≥ 5 e <5 observamos que o grupo B apresenta significativamente mais valores de IGFBP-1 abaixo de 5 que o grupo A ($P=0,01$) mostrando assim uma tendência a valores menores de IGFBP-1 no grupo B, portanto os níveis séricos de IGFBP-1 também não explicam a diminuição da velocidade de crescimento com o tratamento pois para justificar uma diminuição da bioatividade do IGF-I esperaríamos níveis elevados de IGFBP-1.

Não encontramos diferença estatística nos níveis séricos de insulina quando comparamos o grupo tratado com o não tratado, porém existe relatos de uma piora da resistência insulínica com o tratamento com análogos do GnRH (SØRENSEN et al., 2010). Apesar das concentrações semelhantes de insulina nos grupos A e B, ao compararmos os grupos em

pares observamos que as concentrações séricas de insulina foram estatisticamente menores no grupo controle em relação ao grupo A ($p=0,005$) e uma tendência a valores menores, porém não significativos, quando comparado ao grupo B ($P=0,06$) e não houve diferença entre os grupos A e B ($p=0,27$). (Figura 8). Sendo assim consideramos que os valores no grupo B foram intermediários, ou seja, maiores que o controle e menores que o grupo A, ao contrário do que já foi descrito na literatura, o nosso trabalho mostra uma tendência a diminuição da insulina com o tratamento com análogos do GnRH.

Ao analisarmos os resultados da insulina e da IGFBP-1 em conjunto, observamos que ambas apresentam uma tendência a diminuição com o tratamento. Esse dado é confirmado pelo fato que ao analisarmos os 3 grupos (controle, A e B) não encontramos a correlação negativa entre insulina e IGFBP-1 já bem conhecida e fundamentada na literatura. Essa correlação aparece quando avaliamos somente o grupo controle e grupo A e desaparece quando acrescentamos o grupo B na análise. Esses achados sugerem que exista uma outra regulação negativa da IGFBP-1, e não a insulina, nos casos de meninas com puberdade precoce central durante o tratamento com análogos do GnRH.

Após análise de todos os resultados em conjunto sugerimos que o tratamento da puberdade precoce central com análogos do GnRH provoca um bloqueio da sinalização

pós receptor do IGF1R com consequente diminuição da bioatividade do IGF-I, aumento da expressão do IGF1R como mecanismo compensatório, aumento da secreção do GH devido falta de feedback negativo hipofisário e esse aumento da secreção do GH explicaria os níveis séricos elevados de IGF-I e IGFBP-3 e os níveis diminuídos de IGFBP-1.

De todas as meninas avaliadas com puberdade precoce central, tivemos a oportunidade de avaliar 6 casos antes e durante o tratamento, ou seja, avaliamos prospectivamente a mesma criança. Nenhum dado avaliado dessas meninas separadamente apresentou resultado diferente e os dados em relação a expressão do mRNA do IGF1R se tornaram ainda mais significativos confirmando um aumento da expressão do mRNA do IGF1R no grupo tratado ($p=0,008$). Sendo assim essas 6 meninas reforçam o achado global do nosso estudo.

É importante ressaltar que as alterações observadas não permitem assertivos sobre o que ocorre a nível tecidual, mas na maioria das situações os achados séricos refletem os achados teciduais.

CONCLUSÃO

As variações nas concentrações séricas de IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-1 e insulina não explicam a desaceleração da velocidade de crescimento durante o tratamento de

meninas com puberdade precoce central com análogos do GnRH.

O aumento da expressão do IGF1R parece refletir uma redução da sinalização intra celular do IGF1R com consequente diminuição da bioatividade do IGF-I em um mecanismo de feedback de alça ultra curta.

REFERÊNCIAS

- APPLIED BIOSYSTEMS. High-Capacity cDNA Archive Kit. p. 1–32, 2009.
- ARRIGO, T.; DE LUCA, F.; ANTONIAZZI, F.; GALLUZZI, F.; SEGNI, M.; ROSANO, M.; MESSINA, M. F.; LOMBARDO, F. Reduction of baseline body mass index under gonadotropin-suppressive therapy in girls with idiopathic precocious puberty. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 150, n. 4, p. 533–7, abr. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15080784>>. Acesso em: 8 jul. 2015.
- BEDOGNI, G.; GIANNONE, G.; MAGHNIE, M.; GIACOMOZZI, C.; DI IORGI, N.; PEDICELLI, S.; PESCHIAROLI, E.; MELIOLI, G.; MURACA, M.; CAPPÀ, M.; CIANFARANI, S. Serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) reference ranges for chemiluminescence assay in childhood and adolescence. Data from a population of in- and out-patients. **Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society**, v. 22, n. 3-4, p. 134–8, jan. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22583946>>. Acesso em: 25 set. 2015.
- BELCHETZ, P. E.; PLANT, T. M.; NAKAI, Y.; KEOGH, E. J.; KNOBIL, E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. **Science (New York, N.Y.)**, v. 202, n. 4368, p. 631–3, 10 nov. 1978. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/100883>>. Acesso em: 20 jun. 2015.
- BRITO, V. N.; BATISTA, M. C.; BORGES, M. F.; LATRONICO, A. C.; KOHEK, M. B. F.; THIRONE, A. C. P.; JORGE, B. H.; ARNHOLD, I. J. P.; MENDONÇA, B. B. Diagnostic value of fluorometric assays in the evaluation of precocious puberty. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 1999.
- BRITO, V. N.; LATRONICO, A. C.; ARNHOLD, I. J. P.; MENDONÇA, B. B. A single luteinizing

hormone determination 2 hours after depot leuprolide is useful for therapy monitoring of gonadotropin-dependent precocious puberty in girls. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 9, p. 4338–4342, 2004.

BULCAO MACEDO, D.; NAHIME BRITO, V.; LATRONICO, A. C. New Causes of Central Precocious Puberty: The Role of Genetic Factors. **Neuroendocrinology**, v. 100, n. 1, p. 1–8, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.karger.com/Article/FullText/366282>>. Acesso em: 13 jul. 2015.

CAREL, J.-C.; EUGSTER, E. A.; ROGOL, A.; GHIZZONI, L.; PALMERT, M. R.; ANTONIAZZI, F.; BERENBAUM, S.; BOURGUIGNON, J.-P.; CHROUSOS, G. P.; COSTE, J.; DEAL, S.; DE VRIES, L.; FOSTER, C.; HEGER, S.; HOLLAND, J.; JAHNUKAINEN, K.; JUUL, A.; KAPLOWITZ, P.; LAHLOU, N.; LEE, M. M.; LEE, P.; MERKE, D. P.; NEELY, E. K.; OOSTDIJK, W.; PHILLIP, M.; ROSENFELD, R. L.; SHULMAN, D.; STYNE, D.; TAUBER, M.; WIT, J. M. Consensus statement on the use of gonadotropin-releasing hormone analogs in children. In: *Pediatrics*, **Anais...**2009.

COOKMAN, C. J.; BELCHER, S. M. Estrogen Receptor β Upregulates IGF1R Expression and Activity to Inhibit Apoptosis and Increase Growth of Medulloblastoma. **Endocrinology**, v. 156, n. October, p. en20151141, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25885794>>.

CUSTODIO, R. J.; DO CARMO CUSTODIO, V. I.; SCRIDEI, C. A.; SADER MILANI, S. L.; CERVI, M. C.; CUPO, P.; MARTINELLI, C. E. Impact of hypoxia on IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, ALS and IGFBP-1 regulation and on IGF1R gene expression in children. **Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society**, v. 22, n. 5, p. 186–91, out. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096637412000639>>. Acesso em: 24 jun. 2015.

HANNON, T. S.; JANOSKY, J.; ARSLANIAN, S. A. Longitudinal study of physiologic insulin resistance and metabolic changes of puberty. **Pediatric research**, v. 60, n. 6, p. 759–63, dez. 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1203/01.pdr.0000246097.73031.27>>. Acesso em: 3 jul. 2015.

HARRIS, D. A.; VAN VLIET, G.; EGLI, C. A.; GRUMBACH, M. M.; KAPLAN, S. L.; STYNE, D. M.; VAINSEL, M. Somatomedin-C in normal puberty and in true precocious puberty before and after

treatment with a potent luteinizing hormone-releasing hormone agonist. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 61, n. 1, p. 152–9, jul. 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3889035>>. Acesso em: 3 jul. 2015.

HEGER, S.; PARTSCH, C. J.; SIPPELL, W. G. Long-term outcome after depot gonadotropin-releasing hormone agonist treatment of central precocious puberty: final height, body proportions, body composition, bone mineral density, and reproductive function. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 84, n. 12, p. 4583–90, dez. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10599723>>. Acesso em: 17 jun. 2015.

HERMAN-GIDDENS, M. E.; SLORA, E. J.; WASSERMAN, R. C.; BOURDONY, C. J.; BHAPKAR, M. V.; KOCH, G. G.; HASEMEIER, C. M. Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in office practice: a study from the Pediatric Research in Office Settings network. **Pediatrics**, v. 99, n. 4, p. 505–12, abr. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9093289>>. Acesso em: 8 maio. 2015.

JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine reviews**, v. 16, n. 1, p. 3–34, fev. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7758431>>. Acesso em: 7 jun. 2015.

JUNG, M. K.; SONG, K. C.; KWON, A. R.; CHAE, H. W.; KIM, D. H.; KIM, H.-S. Adult height in girls with central precocious puberty treated with gonadotropin-releasing hormone agonist with or without growth hormone. **Annals of pediatric endocrinology & metabolism**, v. 19, n. 4, p. 214–9, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4316408&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 4 fev. 2016.

JUUL, A. **Serum levels of insulin-like growth factor i and its binding proteins in health and disease**. [s.l.: s.n.]v. 13

JUUL, A.; BANG, P.; HERTEL, N. T.; MAIN, K.; DALGAARD, P.; JØRGENSEN, K.; MÜLLER, J.; HALL, K.; SKAKKEBAEK, N. E. Serum insulin-like growth factor-I in 1030 healthy children, adolescents, and adults: relation to age, sex, stage of puberty, testicular size, and body mass index. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 78, n. 3, p. 744–52, mar. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8126152>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

- JUUL, A.; DALGAARD, P.; SKAKKEBAEK, N. Serum levels of Insulin-like Growth Factor (IGF)-Binding Protein-3 (IGFBP-3) in healthy infants, children and adolescents: the relation to IGF-1, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, age, sex, body mass index, and pubertal maturation. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 80, p. 2536–2542, 1995.
- JUUL, A.; SCHEIKE, T.; NIELSEN, C. T.; KRABBE, S.; MÜLLER, J.; SKAKKEBAEK, N. E. Serum Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) and IGF-Binding Protein 3 Levels Are Increased in Central Precocious Puberty: Effects of Two Different Treatment Regimens with Gonadotropin-Releasing Hormone Agonists, without or in Combination with an Antiandrog. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 80, n. 10, p. 3059–67, 1 out. 1995. Disponível em: <http://press.endocrine.org/doi/10.1210/jcem.80.10.7559897?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pu b%3dpubmed>. Acesso em: 2 jul. 2015.
- KAISER, U. B.; KUOHUNG, W. KiSS-1 and GPR54 as new players in gonadotropin regulation and puberty. **Endocrine**, v. 26, n. 3, p. 277–84, abr. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16034182>>. Acesso em: 17 ago. 2015.
- KANETY, H.; KARASIK, A.; PARIENTE, C.; KAUSCHANSKY, A. Insulin-like growth factor-I and IGF binding protein-3 remain high after GnRH analogue therapy in girls with central precocious puberty. **Clinical endocrinology**, v. 45, n. 1, p. 7–12, jul. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8796132>>. Acesso em: 2 jul. 2015.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>>. Acesso em: 9 jul. 2014.
- MACEDO, D. B.; CUKIER, P.; MENDONÇA, B. B.; LATRONICO, A. C.; BRITO, V. N. [Advances in the etiology, diagnosis and treatment of central precocious puberty]. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 58, n. 2, p. 108–17, mar. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24830587>>. Acesso em: 2 jul. 2015.
- MARSHALL, W. A.; TANNER, J. M. Variations in pattern of pubertal changes in girls. **Archives of disease in childhood**, v. 44, n. 235, p. 291–303, jun. 1969. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2020314&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 28 abr. 2015.
- MARTINELLI JR, C. E.; CUSTÓDIO, R. J.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. **Fisiologia do eixo GH-sistema IGF** Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, 2008. .
- MIDYETT, L. K.; MOORE, W. V.; JACOBSON, J. D. Are pubertal changes in girls before age 8 benign? **Pediatrics**, v. 111, n. 1, p. 47–51, jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12509553>>. Acesso em: 27 jul. 2015.
- MORAN, A.; JACOBS, D. R.; STEINBERGER, J.; COHEN, P.; HONG, C. P.; PRINEAS, R.; SINAÏKO, A. R. Association between the insulin resistance of puberty and the insulin-like growth factor-I/growth hormone axis **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 2002. .
- PALMERT, M. R.; MANSFIELD, M. J.; CROWLEY, W. F.; CRIGLER, J. F.; CRAWFORD, J. D.; BOEPPLE, P. A. Is obesity an outcome of gonadotropin-releasing hormone agonist administration? Analysis of growth and body composition in 110 patients with central precocious puberty. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 84, n. 12, p. 4480–8, dez. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10599706>>. Acesso em: 2 jul. 2015.
- PARENT, A. S.; TEILMANN, G.; JUUL, A.; SKAKKEBAEK, N. E.; TOPPARI, J.; BOURGUIGNON, J. P. The Timing of Normal Puberty and the Age Limits of Sexual Precocity: Variations around the World, Secular Trends, and Changes after Migration. **Endocrine Reviews**, v. 24, n. 5, p. 668–693, 2003.
- PASQUINO, A. M.; PUCARELLI, I.; ACCARDO, F.; DEMIRAJ, V.; SEGNI, M.; DI NARDO, R. Long-term observation of 87 girls with idiopathic central precocious puberty treated with gonadotropin-releasing hormone analogs: impact on adult height, body mass index, bone mineral content, and reproductive function. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 93, n. 1, p. 190–5, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17940112>>. Acesso em: 8 jul. 2015.
- PASQUINO, A. M.; PUCARELLI, I.; SEGNI, M.; MATRUNOLA, M.; CERRONE, F. **Adult Height in Girls with Central Precocious Puberty Treated with Gonadotropin-Releasing Hormone Analogues and Growth Hormone** **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** **Endocrine**

Society, 1 jul. 2013. Disponível em: <http://press.endocrine.org/doi/10.1210/jcem.84.2.5431?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed>. Acesso em: 4 fev. 2016.

PELTEK KENDIRCI, H. N.; AĞLADIOĞLU, S. Y.; ÖNDER, A.; BAŞ, V. N.; ÇETINKAYA, S.; AYCAN, Z. Effects of GnRH analogue treatment on anterior pituitary hormones in children with central precocious puberty. **Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM**, 22 maio 2015. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/jpem.ahead-of-print/jpem-2014-0222/jpem-2014-0222.xml>>. Acesso em: 3 jul. 2015.

PERRY, R. J.; FARQUHARSON, C.; AHMED, S. F. The role of sex steroids in controlling pubertal growth. **Clinical endocrinology**, v. 68, n. 1, p. 4–15, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17645565>>. Acesso em: 19 jan. 2016.

PUCARELLI, I.; SEGNI, M.; ORTORE, M.; ARCADI, E.; PASQUINO, A. M. Effects of combined gonadotropin-releasing hormone agonist and growth hormone therapy on adult height in precocious puberty: a further contribution. **Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM**, v. 16, n. 7, p. 1005–10, set. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14513877>>. Acesso em: 4 fev. 2016.

PUCARELLI, I.; SEGNI, M.; ORTORE, M.; MORETTI, A.; IANNACCONE, R.; PASQUINO, A. M. Combined therapy with GnRH analog plus growth hormone in central precocious puberty. **Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM**, v. 13 Suppl 1, p. 811–20, jul. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10969926>>. Acesso em: 4 fev. 2016.

RICCO, R. C. **Avaliação da expressão do receptor tipo 1 dos fatores de crescimento insulina símile (igf1r) em crianças obesitas altas**. 2014. FMRP-USP, 2014.

RINDERKNECHT, E.; HUMBEL, R. E. Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities: evidence for structural homology with insulin B chain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 12, p. 4379–4381, 1976.

SADER MILANI, S. L. **Caracterização clínica e laboratorial de crianças e adolescentes com insensibilidade parcial ao hormônio de**

crescimento ou ao igf-i. 2009. 2009.

SALES, D. S.; MOREIRA, A. C.; CAMACHO-HÜBNER, C.; RICCO, R. G.; DANELUZZI, J. C.; CAMPOS, A. D.; MARTINELLI, C. E. Serum insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3 in girls with premature thelarche. **Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM**, v. 16, n. 6, p. 827–33, jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12948294>>. Acesso em: 3 jul. 2015.

SALMON, W. D.; DAUGHADAY, W. H. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 49, n. 6, p. 825–36, jun. 1957. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13429201>>. Acesso em: 17 ago. 2015.

SARFSTEIN, R.; WERNER, H. Minireview: Nuclear insulin and insulin-like growth factor-1 receptors: A novel paradigm in signal transduction. **Endocrinology**, v. 154, n. 5, p. 1672–1679, 2013.

SCRIDELI CA, T. L. Técnicas de biologia molecular em doenças onco-hematológicas da infância. In: **Hematologia para o Pediatra**. [s.l.: s.n.]p. 457–71.

SONG, H. S.; CHOI, W. B.; SONG, J. S.; HWANG, I. T.; YANG, S. Relationship between serum insulin-like growth factor-1, IGF binding protein-3 levels and body height before and after gonadotropin-releasing hormone agonist therapy. **Annals of pediatric endocrinology & metabolism**, v. 19, n. 4, p. 208–13, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4316410&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 jul. 2015.

SØRENSEN, K.; MOURITSEN, A.; MOGENSEN, S. S.; AKSGLAEDE, L.; JUUL, A. Insulin sensitivity and lipid profiles in girls with central precocious puberty before and during gonadal suppression. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 2010.

SORIANO-GUILLÉN, L.; CORRIPIO, R.; LABARTA, J. I.; CAÑETE, R.; CASTRO-FEIJÓO, L.; ESPINO, R.; ARGENTE, J. Central precocious puberty in children living in Spain: incidence, prevalence, and influence of adoption and immigration. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 95, n. 9, p. 4305–13, set. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20554707>>. Acesso em: 30 jul. 2015.

TEILMANN, G.; PEDERSEN, C. B.; JENSEN, T. K.; SKAKKEBAEK, N. E.; JUUL, A. Prevalence and incidence of precocious pubertal development in Denmark: an epidemiologic study based on national registries. **Pediatrics**, v. 116, n. 6, p. 1323–8, dez. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16322154>>. Acesso em: 30 jul. 2015.

WANG, C.-L.; LIANG, L.; LIU, P.-N.; JIN, X.-J.; CHEN, L.-Q.; YANG, F.; LIAN, Q.; CHEN, R.-M. [Effects of gonadotropin releasing hormone analog and growth hormone on height in girls with idiopathic central precocious puberty]. **Zhongguo dang dai er ke za zhi = Chinese journal of contemporary pediatrics**, v. 16, n. 1, p. 25–30, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24461173>>. Acesso em: 4 fev. 2016.

WENNINK, J. M.; DELEMARRE-VAN DE WAAL, H. A.; SCHOEMAKER, R.; BLAAUW, G.; VAN DEN BRAKEN, C.; SCHOEMAKER, J. Growth hormone secretion patterns in relation to LH and estradiol secretion throughout normal female puberty. **Acta endocrinologica**, v. 124, n. 2, p. 129–35, fev. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2003372>>. Acesso em: 2 jul. 2015.

WERNER, H.; SARFSTEIN, R. Transcriptional and epigenetic control of IGF1R gene expression: Implications in metabolism and cancer. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 24, n. 4, p. 112–118, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ghir.2014.03.006>>.

YU, H.; MISTRY, J.; NICAR, M. J.; KHOSRAVI, M. J.; DIAMANDIS, A.; VAN DOORN, J.; JUUL, A. Insulin-like growth factors (IGF-I, free IGF-I and IGF-II) and insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-6, and ALS) in blood circulation. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 13, n. 4, p. 166–72, jan. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10414596>>. Acesso em: 2 jul. 2015.

Tabela 1: Dados clínicos dos participantes do estudo. As características idade, estatura e velocidade de crescimento (VC) estão representadas em média e desvios padrão. Z escores e Índice de Massa Corpórea (IMC) estão representados em mediana e intervalo interquartil.

	Controles	Grupo A	Grupo B
Gênero	10M/8F	0M/16F	0M/17F
Idade	7,1 ± 1,3	8,0 ± 0,7	9,4 ± 0,8
Estatura	120,9 ± 8,05	135,2 ± 3,25	143,4 ± 4,25
Z Escore estatura	+ 0,12 (-0,33; +0,49)	+1,71 (+1,41; +2,27)	+1,96 (+0,95; +2,79)
VC	-----	9,2 ± 1,9	5,3 ± 1,4
Z escore VC	-----	+ 4,18 (+2,51; +7,26)	- 0,30 (-1,42; +1,49)
IMC	15,8	19,2	22

Tabela 2: Valores da expressão do IGF1R e concentrações séricas de IGF-I, IGFBP-3, Relação molar e IGFBP-1 e insulina representados em mediana e intervalo interquartil.

	CONTROLE	Grupo A	Grupo B
IGF1R ($2^{-\Delta\Delta CT}$),	1,150 (0,70; 1,72)	1,321 (1,02; 1,85)	2,335 (1,10; 11,5)
IGF-I (ng/ml)	144 (122; 191)	395 (321; 458)	437 (369; 533)
IGFBP-3 (mg/L)	3,9 (3,1; 4,3)	4,9 (4,3; 5,9)	5,7 (4,8; 6,2)
Relação molar	0,153 (0,135; 0,181)	0,293 (0,265; 0,345)	0,292 (0,257; 0,344)
IGFBP-1 ng/ml	38,5 (24,7; 64,2)	7,0 (3,8; 15,1)	2,6 (1,4; 8,6)
Insulina uIU/ml	3,6 (2,5; 5,6)	8,3 (5,0; 13,5)	7,00 (4,5; 10,5)

Figura 1: Expressão do mRNA do IGF1R no grupo controle (verde), no grupo sem tratamento (azul) e no grupo tratado (vermelho). A linha contínua representa mediana e a linha tracejada representa o valor 2 assumido como limite superior.

Figura 2: Concentrações séricas de IGF-I (ng/ml) e IGFBP-3 (mg/l) no grupo controle (verde), no grupo sem tratamento (azul) e no grupo tratado (vermelho). A linha contínua representa mediana de cada grupo.

Figura 3: Concentrações séricas de IGFBP-1 (ng/ml) no grupo controle (verde), no grupo sem tratamento (azul) e no grupo tratado (vermelho). A linha contínua representa mediana de cada grupo.

Figura 4: Concentrações séricas de insulina (mUI/ml) no grupo controle (verde), no grupo sem tratamento (azul) e no grupo tratado (vermelho). A linha contínua representa mediana de cada grupo.