UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

FLÁVIA RAQUEL ROSA JUNQUEIRA

*Uso do análogo do GnRH para diagnóstico de puberdade
precoce*

RIBEIRÃO PRETO

2007

FLÁVIA RAQUEL ROSA JUNQUEIRA

***Uso do análogo do GnRH para diagnóstico de puberdade
precoce***

Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Medicina.

Área de concentração: Tocoginecologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis

RIBEIRÃO PRETO

2007

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.

Junqueira, Flávia Raquel Rosa. Uso do análogo do GnRH para diagnóstico de puberdade precoce. Ribeirão Preto, 2007.

64p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Tocoginecologia.

Orientadora: Reis, Rosana Maria dos

1. Análogo do GnRH. 2. Puberdade precoce. 3. Diagnóstico.

“Quero, um dia, poder dizer às pessoas que nada
foi em vão... Que o amor existe, que vale a pena
se doar às amizades e às pessoas, que a vida é
bela sim, e que eu sempre dei o melhor de
mim... e que valeu a pena.”

(Mário Quintana)

DEDICO ESSE TRABALHO:

A Deus,
pelo dom da vida.

Aos meus pais, **Luíz Gonzaga Junqueira e Aurélia Georgina
Roza Junqueira**, que foram sempre exemplos de vida, coragem
e amor. Vocês são um presente de Deus!

A minha sobrinha e afilhada, **Ana Carolina**, que trouxe tanta
alegria e luz à nossa família.

A minha orientadora, **Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis**,
pelos conhecimentos compartilhados durante a minha formação,
e pelo exemplo de mulher e profissional.

AGRADECIMENTOS

Às meninas que colaboraram com esse estudo, assim como às suas mães que permitiram sua participação nesse trabalho.

À Profa. Dra. Cristina Laguna Benetti Pinto e ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Martinelli Junior pela disponibilidade em participar de minha banca, o que resultou em valiosas contribuições a esse trabalho.

Às Profas. Dras. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva e Maristela Carbol Patta pela participação em minha banca de qualificação e amizade em todo esse período de convivência.

Às funcionárias do laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, Auxiliadora e Sandra, pela contribuição através da realização do teste do aGnRH; e Albina, responsável pela realização dos ensaios laboratoriais desta pesquisa.

Um agradecimento especial à Carolina Sales e Wellington, pela amizade, troca de aprendizado e pelos favores prestados durante esse período de especialização. A ajuda de vocês foi fundamental para a concretização deste trabalho.

A todos que compõem o Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, docentes, médicos assistentes e funcionários, pela minha formação profissional. Um abraço especial a Ilza, pela competência e disponibilidade, assim como pelo carinho e atenção.

À grande amiga e colega, Lúcia Alves da Silva Lara. Graças aos seus ensinamentos e incentivo tive o privilégio de conhecer e estudar a sexualidade humana. Tenho certeza que a nossa parceria junto ao Ambulatório de Estudos em Sexualidade Humana (AESH) ainda vai render inúmeros frutos.

À Adriana Peterson Mariano Salata Romão e Alessandra Ricci Dias Manganaro, pela amizade e parceria profissional, que germinou e cresceu durante nossas viagens a São Paulo, para o curso de especialização em Terapia Sexual.

Aos meus companheiros de trabalho na Mater: Dra. Silvana, Dr. Ricardo, Maria Rita, Areana, Toninho, Nelson, Conrado, Cláudia, Fernando, Alexandre, Aninha e Marcos. É um prazer trabalhar com vocês!

Aos meus colegas de trabalho no CEMED: Wagner, Luciana, Mauro, Fabiana e Erci, pelos valiosos ensinamentos sobre a atuação profissional nos convênios, uma realidade bastante diferente da do SUS.

Aos meus amigos, aqui de Ribeirão, que se tornaram para mim uma segunda família: Flavita, Claudinha, Mary, Dani, Conrads, Luciana, Mauritchos, Camilinha e Karol. É um privilégio caminhar ao lado de vocês.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com este trabalho.

RESUMO

RESUMO

JUNQUEIRA, F.R.R. **Uso do análogo do GnRH para diagnóstico de puberdade precoce.** 2007. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Introdução - A puberdade precoce verdadeira ou dependente de GnRH apresenta importante morbidade: a baixa estatura, consequência da rápida progressão da idade óssea, além das seqüelas psico-emocionais do desenvolvimento sexual secundário precoce. Daí a importância da realização de um diagnóstico precoce e preciso, a fim de que a terapêutica adequada seja instituída o quanto antes. O uso do análogo do GnRH (aGnRH) em teste diagnóstico vem sendo utilizado com este objetivo. Neste estudo avaliou-se os valores de corte para o diagnóstico de puberdade precoce verdadeira, usando-se o teste do aGnRH.

Material e métodos - Estudo prospectivo, com 44 meninas, com desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários antes dos 8 anos de idade, atendidas no Ambulatório de Ginecologia Infanto-Puberal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Realizou-se, em todos os casos, o teste do aGnRH, que consistiu na coleta de amostra sanguínea basal para dosagem de FSH e LH, seguida da aplicação subcutânea de 500µg de acetato de leuprolida (Lupron®). Novas amostras sanguíneas foram realizadas após 3 horas, para dosagem de FSH e LH, e após 24 horas da aplicação, para dosagem de estradiol

Compararam-se os níveis de LH e FSH basais, de 3 horas e a relação LH/FSH obtida, além do estradiol de 24h, com a evolução clínica das pacientes. Este foi o padrão ouro utilizado para análise do teste, sendo que, após 6 meses, as pacientes foram divididas em 2 grupos: puberdade progressiva (puberdade precoce verdadeira) e não-

progressiva. Para análise estatística, utilizou-se curvas ROC, estabelecendo-se sensibilidade, especificidade e melhor nível de corte para o diagnóstico de puberdade precoce verdadeira, para os diferentes critérios analisados. Além disso, avaliou-se a concordância entre os diversos tipos de análise do teste, através do coeficiente kappa.

Resultados – O LH de 3 horas apresentou valor de corte $> 4,5$ mUI/mL, sensibilidade 59,1% e especificidade 86,4%, com área sobre a curva de 0,723. O valor de kappa foi de 0,45, com concordância de 0,73. O estradiol de 24 horas apresentou valor de corte $> 40,6$ pg/mL, sensibilidade 70% e especificidade 73,7%, com área sobre a curva de 0,703. O valor de kappa foi de 0,436, com concordância de 0,718.

Dentre todos os critérios analisados, o melhor deles foi a relação LH/FSH de 3 horas, com valor de corte $> 0,14$, sensibilidade 72,7% e especificidade 77,3%, com área sobre a curva de 0,771. O valor de kappa foi de 0,5, com concordância de 0,75.

Conclusões - Em nossa avaliação, a relação LH/FSH de 3 horas foi superior ao valor de LH de 3 horas ou estradiol de 24 horas, que haviam sido os melhores critérios diagnósticos no trabalho pioneiro na utilização deste teste.

Palavras chaves – Puberdade precoce, diagnóstico, análogo do GnRH

ABSTRACT

ABSTRACT

JUNQUEIRA, F.R.R. **Use of GnRH analogue for diagnosis of precocious puberty.** 2007. Thesis – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Introduction – True or GnRH-dependent precocious puberty involves important morbidity such as short stature due to the rapid progression of bone age, as well as psycho-emotional sequels of precocious secondary sexual development. Thus, it is important to make an early and precise diagnosis so that appropriate treatment can be instituted as early as possible. The GnRH analogue (aGnRH) in the diagnostic test has been used for this purpose. In the present study, the sensitivity and specificity of different laboratory criteria for the diagnosis of true precocious puberty were compared using the aGnRH test.

Material and methods – This was a prospective study conducted on 44 girls with the development of secondary sexual traits before 8 years of age attended at the Childhood-Pubertal Gynecology Outpatient Clinic of the University Hospital, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

The aGnRH test was performed in all cases, consisting of collection of a basal blood sample for the determination of FSH and LH, followed by subcutaneous application of 500 µg leuprolide acetate (Lupron®). New blood samples were obtained after 3 hours, for the determination of FSH and LH, and after 24 hours of application, for determination of estradiol.

Basal LH and FSH levels and levels after 3 hours, the LH/FSH ratio obtained 3 hours after the administration of 500 µg Lupron®, and 24 hour estradiol levels were compared with the clinical course of the patients. This was the gold standard used for

the analysis of the test and after 6 months the patients were divided into 2 groups: progressive puberty (true precocious puberty) and non-progressive puberty. ROC curves were used for statistical analysis, with the determination of the sensitivity, specificity and best cut-off value for the diagnosis of true precocious puberty of the different criteria analyzed. In addition, the agreement of the various types of test analysis was evaluated using the kappa coefficient.

Results – Three hour LH presented a cut-off value of > 4.5 mIU/mL, 59.1% sensitivity and 86.4% specificity, with an area under the curve of 0.723. The kappa value was 0.45, with 0.73 agreement. Twenty-four hour estradiol presented a cut-off value of > 40.6 pg/mL, 70% sensitivity and 73.7% specificity, with an area under the curve of 0.703. The kappa value was 0.436, with 0.718 agreement.

The best of all criteria used was the 3 hour LH/FSH ratio, with a cut-off value of > 0.14 , 72.7% sensitivity and 77.3% specificity, with an area under the curve of 0.771. The kappa value was 0.5, with 0.75 agreement.

Conclusions – In the present evaluation, the 3 hour LH/FSH ratio was superior to the 3 hour LH value and the 24 hour estradiol value, which had been the best diagnostic criteria in the pioneering study using this test.

Key words – Precocious puberty, diagnosis, GnRH analogue

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Idade da menarca	19
Figura 2 – Curva ROC: LH 3 horas após a injeção de acetato de leuprolida.....	41
Figura 3 – Curva ROC: relação LH/FSH 3 horas após a injeção de acetato de leuprolida	41
Figura 4 – Curva ROC: estradiol 24 horas após a injeção de acetato de leuprolida	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fórmula estrutural do GnRH e análogos	27
Tabela 2 – Dados clínicos e laboratoriais das pacientes	39
Tabela 3 – Desordens do desenvolvimento puberal e sua evolução em 6 meses	40
Tabela 4 – Média dos valores analisados nos grupos com puberdade progressiva e puberdade não-progressiva	43
Tabela 5 – Área sobre a curva ROC, valor de corte, sensibilidade e especificidade dos diferentes critérios analisados	44
Tabela 6 – Tabela de concordância.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AGIP - Ambulatório de Ginecologia Infanto-Puberal

aGnRH - análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas

EPM – erro padrão da média

FSH - hormônio folículo-estimulante

GnRH - hormônio liberador de gonadotrofinas

HC-FMRP-USP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo

hCG - gonadotrofina coriônica humana

HHO – hipotálamo-hipófise-ovariano

IMC - índice de massa corpórea

IO/IC – idade óssea / idade cronológica

LH - hormônio luteinizante

M2 – mamas estadio 2 de Tanner

mUI/mL – micro Unidades Internacionais por Mililitro

P2 – pêlos estadio 2 de Tanner

pg/mL - picogramas por mililitro

pmol/L – picomol por litro

SNC - sistema nervoso central

TSH – hormônio tireotrófico

UI/L - Unidades Internacionais por Litro

µg - microgramas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Puberdade precoce	18
1.2 Etiologia da puberdade precoce	19
1.2.1 Etiologia da puberdade precoce dependente de GnRH	20
1.2.2 Etiologia da puberdade precoce independente de GnRH (pseudopuberdade precoce).....	21
1.3 Avaliação diagnóstica	23
1.4 Análogos do GnRH.....	26
1.5 Teste do análogo do GnRH.....	28
 2. JUSTIFICATIVA	 30
 3. OBJETIVOS.....	 32
 4. MATERIAL E MÉTODOS	 34
4.1 – Material	35
4.2 - Análise estatística	37
 5. RESULTADOS	 38
 6. DISCUSSÃO.....	 46
 7. CONCLUSÕES.....	 51
 8. BIBLIOGRAFIA	 53
 9. ANEXOS.....	 60
Anexo 1: Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo CEP	
Anexo 2: Termo de consentimento livre e esclarecido	
Anexo 3: Estágios de TANNER e MARSHAL	
Anexo 4: Curvas de velocidade de crescimento	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Puberdade Precoce

A idade de início da puberdade varia em função do sexo, etnia, estado de saúde, genética, nutrição e atividade física (PINYERD e ZIPF, 2005). O início da puberdade é cerca de um ano mais precoce em meninas. Em relação à etnia, observa-se que meninas negras entram na puberdade mais cedo que meninas brancas (HERMAN-GIDDENS *et al*, 1997). A influência da genética já ficou demonstrada, em 1962 por TANNER, que observou haver correlação direta entre a menarca de mães e filhas e entre irmãs; pouco se sabe, entretanto, sobre os genes envolvidos. Um fator que vem sendo bastante estudado recentemente é o nutricional; a obesidade leve a moderada está associada à menarca mais precoce, enquanto o baixo peso corpóreo está associado à puberdade mais tardia (KAPLOWITZ *et al*, 2001).

A puberdade precoce, em meninas, consiste no aparecimento dos caracteres sexuais secundários antes dos oito anos de idade ou na ocorrência da menarca antes dos nove anos de idade (PARTSCH *et al*, 2002). Apesar da idade em que ocorre a menarca não ter se alterado muito desde 1960 (Figura 1), estudos recentes indicam que a idade de ocorrência da telarca, evento inicial da puberdade, está ocorrendo cada vez mais cedo: aos sete anos em meninas brancas americanas e aos seis anos em meninas negras americanas (HERMAN-GIDDENS *et al*, 1997). A definição de puberdade precoce, entretanto, mantém-se a citada acima.

Figura 1 – Idade da menarca (TANNER, 1962).

1.2 - Etiologia da puberdade precoce

A etiologia da puberdade precoce é variável, sendo fundamental distinguir-se entre puberdade precoce verdadeira ou dependente de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que resulta da ativação prematura do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano (HHO), da pseudopuberdade precoce ou independente de GnRH.

A puberdade precoce verdadeira é uma doença rara com incidência estimada de 1:5.000 a 1:10.000 crianças (GONZALEZ, 1982; CUTLER, 1988), acometendo, principalmente, o sexo feminino, numa relação de 3:1 (KAPPY e GANONG, 1994) a 23:1 (BRIDGES *et al*, 1994). Pode ter causas orgânicas ou ser idiopática. A distribuição das causas idiopáticas versus orgânicas varia de 69 a 98% de causas idiopáticas em meninas, de 0 a 60% em meninos. Logo, observa-se que o risco de causa orgânica é bem maior em meninos. O risco de causa orgânica também é maior quanto mais precoce ocorrer o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários, em relação à idade (PARTSCH *et al*, 2002).

Levantamento realizado no Ambulatório de Ginecologia Infanto-Puberal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, com 54 pacientes atendidas nos últimos cinco anos, com queixa de aparecimento precoce de mamas e/ou pêlos, encontrou uma incidência de 49% de puberdade precoce verdadeira, 17% de telarca isolada precoce e 34% de pubarca isolada precoce. A média de idade de puberdade precoce verdadeira foi de $5,6 \pm 1,8$ anos. Estas pacientes apresentaram como primeiro sinal de puberdade precoce telarca e pubarca, simultaneamente, em 46% dos casos, telarca em 42% dos casos e pubarca em 12% dos casos. Todos os casos, à exceção de um, tiveram origem idiopática. Houve um caso de hiperplasia adrenal congênita por deficiência de 21-hidroxilase, forma não-clássica, que evoluiu com ativação secundária do eixo HHG (CARVALHO *et al*, 2007).

Uma das conseqüências da puberdade precoce é a baixa estatura resultante no adulto. Devido à alta sensibilidade do esqueleto ao estrogênio, mesmo em níveis baixos, o estímulo hormonal faz com que haja um aumento da taxa de crescimento óssea, resultando em crianças transitoriamente altas para sua idade; mas, como consequência da fusão epifisária precoce, evoluem com baixa estatura na idade adulta (SPEROFF e FRITZ, 2005). Outros riscos associados à puberdade precoce são o abuso sexual e a gestação precoce. Apesar dos aspectos psicológicos e comportamentais serem possíveis indicações para o tratamento da puberdade precoce, esses são aspectos ignorados por diversos autores (PARTSCH *et al*, 2002).

1.2.1 - Etiologia da puberdade precoce dependente de GnRH

Conforme citado anteriormente, a grande maioria dos casos de puberdade precoce verdadeira são idiopáticos, principalmente, em meninas.

Entre as causas orgânicas de puberdade precoce verdadeira, as principais são os tumores do sistema nervoso central (SNC), dentre eles, hamartomas hipotalâmicos, craniofaringiomas, astrocitomas, gliomas, neurofibromas, ependimomas e teratoma supra selar; em geral de localização próxima ao hipotálamo. Há também outras etiologias ligadas ao SNC, porém de origem não-tumoral, como encefalites, meningites, hidrocefalia, doença de von Recklinghausen e trauma crânio-encefálico (SPEROFF e FRITZ, 2005).

Outra causa de puberdade precoce central é o hipotireoidismo. Nesses casos, pode haver galactorréia associado à baixa estatura, mas sem avanço de idade óssea. Essa é a única situação em que há desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários sem avanço da idade óssea, podendo haver inclusive atraso desta. A reposição de hormônio tireoidiano leva à parada da progressão dos caracteres sexuais secundários e até regressão destes (SPEROFF e FRITZ, 2005).

1.2.2 - Etiologia da puberdade precoce independente de GnRH (pseudopuberdade precoce)

A pseudopuberdade precoce pode ser classificada em isossexual, quando os caracteres sexuais secundários são os mesmos do sexo genético da criança; no caso de meninas, cariótipo 46XX, quando há presença de telarca, pubarca e/ou menarca. Outra forma de pseudopuberdade precoce seria a heterossexual, onde as características sexuais secundárias são opostas ao sexo genético da criança; no caso de meninas, 46XX, quando há sinais de virilização e /ou hirsutismo (REIS *et al*, 2002).

A principal causa de puberdade precoce independente de GnRH é a hiperplasia adrenal congênita.

Dos casos de pseudopuberdade precoce em meninas, 11% decorrem de tumores ovarianos, geralmente produtores de estrogênio, como, por exemplo, o tumor de células da granulosa e o tumor de células da teca. Outros tumores podem também ser causa de pseudopuberdade precoce, como gonadoblastoma, teratomas, tumor de células lipóides, cistoadenomas e até mesmo cânceres de ovário. Uma massa pélvica ou abdominal palpável está presente em até 80% destes casos (SPEROFF e FRITZ, 2005).

O uso de hormônios exógenos, presentes em anticoncepcionais orais, anabolizantes ou cremes para cabelo e face, deve ser sempre investigado.

Outra doença associada à puberdade precoce independente de GnRH é a Síndrome de McCune Albright, que consiste na presença de múltiplas lesões císticas disseminadas pelos ossos, com alto risco de fratura, manchas café-com-leite e precocidade sexual. Nesta doença, um defeito na síntese de proteína G gera alteração na sinalização e ativação dos receptores de gonadotrofinas, levando a um estímulo espontâneo da esteroidogênese ovariana com a formação de cistos foliculares produtores de estrogênios (REIS *et al*, 2002). Corresponde a 5% dos casos de puberdade precoce em meninas (SPEROFF e FRITZ, 2005).

A produção ectópica de gonadotrofina coriônica humana (hCG) é uma causa rara de precocidade sexual, correspondendo a 0,5% dos casos. Os tumores produtores de hCG mais comuns são o corioepitelioma e disgerminoma de ovário, e o hepatoblastoma. Consideramos esses casos como puberdade precoce independente de GnRH, por não se tratarem de tumores de origem central e também por não haver ativação do eixo HHO (REIS *et al*, 2002). SPEROFF & FRITZ (2005) classificam essa produção ectópica de hCG como puberdade precoce verdadeira, por considerar que a ação deste hormônio seria semelhante à do LH.

Cabe ressaltar que a puberdade precoce de origem periférica pode levar a uma

ativação secundária do eixo HHO com o desenvolvimento e a superposição de puberdade precoce dependente de GnRH. Presumivelmente, o mecanismo central só é ativado quando o desenvolvimento puberal decorrente de secreção hormonal periférica atinge um nível crítico de desenvolvimento somático (REIS *et al*, 2002).

1.3 - Avaliação diagnóstica

O diagnóstico de puberdade precoce é baseado na história clínica, exame físico e exames complementares.

A anamnese deve conter a idade do aparecimento dos caracteres sexuais secundários, a evolução destes sinais, assim como a velocidade de crescimento durante os últimos 6 a 12 meses. Importante avaliar se há história familiar positiva para puberdade precoce. Investigar sobre a presença de doenças de base (doenças genéticas, deformidades ósseas, hiperplasia adrenal congênita, tumores) e eventuais medicamentos em uso pela criança ou usados pela mãe durante a gestação e puerpério. Deve ser analisada a estatura dos pais para fins de cálculo da estatura final estimada da menina, conforme fórmula abaixo.

$\text{Estatura estimada} = \frac{\text{altura do pai (cm)} + \text{altura da mãe (cm)} - 13}{2} \pm 10 \text{ cm}$

O exame físico deve incluir, além do estadiamento do desenvolvimento das mamas e pêlos pubianos, exame físico geral, peso, altura, índice de massa corpórea (IMC), relação estatura-envergadura, padrão de distribuição de gordura corporal, avaliação da presença de acne, pêlos axilares, hirsutismo, manchas café-com-leite, deformidades ósseas e exame da genitália externa. Importante analisar peso e altura em relação à curva de velocidade de crescimento.

A realização de exames complementares é importante para a identificação da etiologia da doença. Para identificação da idade biológica da criança, deve ser realizada uma radiografia de mão e punho esquerdo, para avaliação da idade óssea. O achado de idade óssea acelerada mais que dois desvios-padrões da idade cronológica reforça a possibilidade de tratar-se de uma variante anormal do desenvolvimento puberal (PARTSCH *et al*, 2002).

O ultra-som pélvico é importante exame a ser realizado em meninas, para avaliação da presença de folículos ovarianos e da relação corpo-colo do útero. Os ultra-sons abdominal e pélvico são úteis para detecção de tumores ovarianos ou adrenais (PARTSCH *et al*, 2002). Em todas as crianças com suspeita de puberdade precoce verdadeira é mandatória a realização de tomografia computadorizada ou ressonância magnética de crânio e sela túrsica, para exclusão de causas centrais, visto que a puberdade precoce pode ser o único sintoma de um tumor ou má-formação intracraniana. O exame mais sensível seria a ressonância magnética, que permite identificar mesmo pequenos tumores, como o hamartoma hipotalâmico, a mais comum lesão de SNC associada à puberdade precoce verdadeira em meninas (SPEROFF e FRITZ, 2005).

A avaliação hormonal inicial deve incluir dosagens séricas dos hormônios folículo-estimulante (FSH), luteinizante (LH) e estradiol, hormônio tireotrófico (TSH) e teste funcional do eixo HHO. As dosagens basais de LH e FSH com os métodos dosimétricos convencionais, como o radioimunoensaio e o ensaio imunoradiométrico, não são de grande valia. Já com ensaios de imunoquimioluminescência de terceira geração com alta sensibilidade é possível detectar níveis discretamente aumentados de gonadotrofinas (NEELY *et al*, 1995). Os valores normais de LH e FSH por radioimunoensaio em mulheres no menacme são de 5 a 20 UI/L. Já os valores de

normalidade por imunoquimioluminescência são para o FSH de 2,8 a 14,4 mUI/mL e para o LH de 1,1 a 11,6 mUI/mL. Variações nesses valores podem ocorrer em função do *kit* utilizado na dosagem.

O teste funcional do eixo HHO, como a administração do GnRH é um teste dinâmico que consiste na administração endovenosa de GnRH (gonadorelina) na dose de 100 µg com dosagens séricas de FSH e LH nos tempos zero e 30 minutos após a infusão. Outros protocolos existem, com dosagens múltiplas de FSH e LH, mas não há incremento no valor diagnóstico em relação às dosagens nos tempos zero e 30 minutos (CAVALLO *et al*, 1995). O teste do GnRH é importante para a diferenciação entre puberdade precoce dependente e independente de GnRH. No caso da primeira, há uma resposta predominante do LH, comparado ao FSH, sendo que esta resposta não só é maior do que a esperada para a fase pré-puberal, como também é maior do que a esperada para o mesmo estágio puberal normal (PARTSCH *et al*, 2002).

Há vários critérios para interpretação do teste do GnRH. Um deles é a relação LH/FSH pós-teste do GnRH, com nível de corte maior que 1,0, como indicativa de puberdade precoce verdadeira (PARTSCH *et al*, 1989). Entretanto, nem sempre os resultados dessa relação condizem com os aspectos clínicos, sugerindo uma falha no reconhecimento de uma parcela dos casos de puberdade precoce verdadeira, devido à limitada sensibilidade e acurácia deste critério diagnóstico. OERTER *et al* (1990) sugeriram que um ponto de corte menor que 1 para a relação LH/FSH possa ser o método mais específico. Como alternativa, temos a medida dos níveis de LH isoladamente pós-estímulo com GnRH. CAVALLO *et al* (1995) postularam dosagem única de LH > 15 UI/L, 30 minutos após estímulo com GnRH, como critério diagnóstico para puberdade precoce verdadeira. CHOI *et al* (2007), também propõem protocolo com dosagem única de LH > 9mUI/mL (radioimunoensaio), 30 minutos após

estímulo com GnRH, como indicativo de puberdade precoce verdadeira.

Apesar de o teste do GnRH clássico ser ainda o mais utilizado e importante teste no diagnóstico da puberdade precoce, já há outros propostos na literatura com a mesma finalidade. Entre eles, temos o teste com GnRH subcutâneo com coleta de amostra única de LH 40 minutos após o estímulo (ECKERT *et al*, 1996).

1.4 - Análogos do GnRH

O GnRH induz a secreção dos hormônios FSH e LH, ocorrência crucial no adequado controle da função gonadal. Em humanos, foram isolados três tipos de GnRH, sendo que o papel dos tipos II e III ainda não foi elucidado. O tipo I é o clássico fator neuroendócrino hipotalâmico, sintetizado pelo diencéfalo e transportado pelos axônios ao terminal neuronal, onde é liberado na circulação porta-hipofisária (VAN LOENEN *et al*, 2002).

A meia-vida do GnRH é de 2 a 4 minutos e a ação hormonal limitada por vários mecanismos como degradação por proteases associadas à membrana, proteólise lisossômica ou inativação primária no hipotálamo por endopeptidases (ABREU *et al*, 2006).

A identificação da sequência de dez aminoácidos do GnRH tipo I em 1971 (SCHALLY *et al*; AMOS *et al*) foi de fundamental importância para o posterior desenvolvimento de substâncias análogas a este hormônio com ação agonista. Essas drogas foram desenvolvidas através da substituição de um ou dois aminoácidos do GnRH.

Os análogos do GnRH (aGnRH) têm o mesmo efeito na liberação de gonadotrofinas que o próprio GnRH após a ligação com o receptor tipo I. A diferença

entre eles se dá na meia-vida e a biodisponibilidade, que são maiores nos primeiros (KARTEN *et al*, 1986). A maior potência dos análogos deve-se a substituição da glicina na posição 6 por D-aminoácidos e pela substituição Gly-NH₂ no C-terminal pelo NH₂-etilamida ligada a prolina na posição 9, resultando em um nonapeptídeo. Há, até o momento, sete drogas aGnRH liberadas para uso clínico (VAN LOENEN *et al*, 2002). A modificação na posição 6 aumenta a meia-vida da molécula, pois esta é a posição de clivagem pelas peptidases, protegendo a sua degradação na circulação sanguínea. As modificações na posição 10 aumentam a afinidade pelo receptor em 100-200 vezes em relação ao GnRH (SHAPIRO, 2003).

Tabela 1 – Fórmula estrutural do GnRH e análogos
(VAN LOENEN *et al*, 2002)

	Seqüência de aminoácidos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂
GnRH humano										
GnRH-I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GnRH-II	1	2	3	4	His	6	Trp	Tyr	9	10
GnRH III	1	2	3	4	5	6	Trp	Leu	9	10
Agonistas do GnRH										
Nonapeptídeos										
Leuprorelin	1	2	3	4	5	d-Leu	7	8	9-	N-Et-NH ₂
Buserelin	1	2	3	4	5	d-Ser(Bu ¹)	7	8	9-	N-Et-NH ₂
Goserelin	1	2	3	4	5	d-Ser(Bu ¹)	7	8	9-	AzaGly-NH ₂
Histrelin	1	2	3	4	5	d-His(ImbzI)	7	8	9-	N-Et-NH ₂
Deslorelin	1	2	3	4	5	d-Trp	7	8	9-	N-Et-NH ₂
Decapeptídeos										
Nafarelin	1	2	3	4	5	(d-Nal) ₂	7	8	9	Gly-NH ₂
Triptorelin	1	2	3	4	5	d-Trp	7	8	9	Gly-NH ₂

A administração contínua do aGnRH (aplicação diária ou em depósito) inicialmente leva a hipersecreção de LH e FSH (efeito flare-up), a qual, após um período de cerca de 10 dias, é seguida pela dessensibilização hipofisária e supressão do LH e FSH. A consequência disto é a inibição da estereoidogênese ovariana e do crescimento folicular. Esta ‘hipofisectomia medicamentosa’ mostrou-se benéfica no

tratamento de algumas doenças reprodutivas esteróides-dependentes, como a puberdade precoce verdadeira e a endometriose, e durante ciclos de reprodução assistida, na prevenção de um pico prematuro de LH (VAN LOENEN *et al*, 2002).

1.5 – Teste do análogo do GnRH

Outro teste diagnóstico para puberdade precoce postulado é o do aGnRH (IBÁÑEZ *et al*, 1994). Este teste se baseia no efeito ‘flare-up’ desencadeado pelo uso do aGnRH; ou seja, em casos onde há ativação do eixo HHO, espera-se que, após o uso deste tipo de droga, haja aumento da secreção das gonadotrofinas. GARIBALDI *et al*, em 1993, foi quem primeiro avaliou a resposta das gonadotrofinas ao estímulo com acetato de leuprolida, em meninas com puberdade precoce. Comparou, então, esta resposta, com os níveis de estradiol também após o estímulo com aGnRH. Observou que em uma fase inicial da puberdade, pode haver desenvolvimento mamário e secreção ovariana clinicamente relevante de estradiol, mesmo que a secreção de LH muitas vezes ainda não seja significativamente elevada, acima dos níveis pré-puberais.

Em 1994, IBÁÑEZ *et al* realizaram, em momentos distintos, o teste do GnRH e o uso do acetato de leuprolida subcutâneo, em pacientes com desordens puberais, avaliando, então, a resposta hipofisária e gonadal ao uso aGnRH, além de comparar o teste do GnRH ao do aGnRH para o diagnóstico de puberdade precoce verdadeira. Observou, então, um pico de LH três horas após a aplicação subcutânea de acetato de leuprolida, e de estradiol 24 horas após. Em caso de LH maior que 8 UI/L (radioimunoensaio) no pico de três horas e estradiol maior que 150 pmol/L em 24 horas, todas as pacientes evoluíram com puberdade progressiva. Por outro lado, somente 40% dos pacientes com puberdade precoce de caráter progressivo foram detectados com o

uso do teste do GnRH. Nestes casos, os valores do pico de LH foram maiores que 7 UI/L. Os autores consideraram, por esse motivo, o teste com aGnRH superior ao teste do GnRH. IBÁÑEZ *et al* continuaram, após essa data, a realizar apenas o teste com aGnRH (1997).

Trabalho recente retoma a provável importância do aGnRH de depósito no diagnóstico da puberdade precoce verdadeira, ao mostrar um pico de LH, de ao menos maior que 10 UI/L, em meninas com puberdade precoce verdadeira, duas horas após injeção de acetato de leuprolida de depósito, o que seria uma alternativa para a detecção desta doença (BRITO *et al*, 2004).

Diante destes aspectos, seria de grande valia a disponibilidade de novos testes e critérios diagnósticos para puberdade precoce verdadeira, que apresentem sensibilidade e acurácia superiores à relação LH/FSH pós-teste de GnRH, permitindo assim um diagnóstico mais precoce e preciso desta morbidade.

2. JUSTIFICATIVA

A puberdade precoce verdadeira ou dependente de GnRH encerra importante morbidade: a baixa estatura, consequência da rápida progressão da idade óssea, e as possíveis seqüelas psico-emocionais do desenvolvimento sexual secundário precoce. Daí a importância da realização de um diagnóstico precoce e preciso, a fim de que seja iniciada o quanto antes a terapêutica adequada, além de descartar os casos que não necessitam de tratamento. O uso do aGnRH em teste diagnóstico parece preencher esse critérios. O estabelecimento de valores para os hormônios hipofisários e gonadais, a partir dos quais podemos firmar o diagnóstico de puberdade precoce verdadeira é necessário para o uso rigoroso deste teste diagnóstico. Já estão validados os valores de corte na dosagem por radioimunoensaio, em população européia, berço deste teste. É preciso, entretanto, a correta validação dos valores de corte, através de dosagem por quimioluminescência, visando o uso adequado deste teste em nossa população.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos:

3.1: Objetivos gerais:

Avaliar o uso do teste com análogo do GnRH para o diagnóstico de puberdade precoce verdadeira.

3.2 Objetivos específicos:

- Confirmar a eficácia do uso de uma dose única de aGnRH, acompanhada das dosagens de LH, FSH e estradiol, após sua administração, para o diagnóstico de puberdade precoce verdadeira em meninas.
- Avaliar os valores de LH e estradiol, dosados por quimioluminescência, a partir dos quais se considerará o diagnóstico de puberdade precoce como verdadeira.
- Comparar a sensibilidade, especificidade e acurácia de diferentes critérios laboratoriais para a confirmação diagnóstica de puberdade precoce verdadeira, a saber, níveis de LH e FSH, além da relação LH/FSH obtidas 3 horas após a administração subcutânea de 500 µg de acetato de leuprolida; e de estradiol 24 horas após a mesma.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Material

Estudo prospectivo, com 44 pacientes do sexo feminino, com desenvolvimento de caracteres sexuais secundários, antes dos 8 anos de idade, atendidas no Ambulatório de Ginecologia Infanto-Puberal (AGIP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP).

Critérios de Inclusão:

- Início do desenvolvimento de caracteres sexuais secundários isossexuais em idade menos que oito anos
- Pacientes submetidas ao protocolo completo de investigação de puberdade precoce verdadeira (vide abaixo)

Critérios de Exclusão:

- Desenvolvimento de caracteres sexuais secundários heterossexuais.
- Pacientes com protocolo de investigação incompleto

As pacientes, com desenvolvimento de caracteres sexuais secundários isossexuais, realizaram os exames do protocolo de investigação de puberdade precoce verdadeira do AGIP, a saber: dosagens hormonais basais, teste com aGnRH, tomografia computadorizada de sela túrsica, ultra-som pélvico e radiografia de mão e punho esquerdo para avaliação da idade óssea.

Nos casos em que o desenvolvimento puberal teve início pela pubarca, foram solicitadas dosagens hormonais de androgênios, para exclusão de hiperplasia adrenal congênita.

O teste com aGnRH consistiu em:

- Coleta de amostra sanguínea basal para dosagem de FSH e LH em jejum.
- Aplicação subcutânea de 500 µg de acetato de leuprolida (Lupron®)
- Coleta de amostras sanguíneas com 3 e 24 horas da aplicação do aGnRH para dosagem de FSH e LH com 3 horas e de estradiol com 24 horas.

As dosagens de LH, FSH e estradiol foram realizadas no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP, pelo método de quimiluminescência, que combina anticorpos específicos com enzima amplificada, em um aparelho *Immulite – Diagnostic Products Corporation* (DPC – Los Angeles - USA), sistema randômico automatizado. A sensibilidade analítica do LH é de 0,05 mUI/mL, do FSH de 0,2 mUI/mL e do estradiol de 8 pg/mL.

Compararam-se, então, os níveis de LH e FSH basais, de 3 horas e a relação LH/FSH obtida 3 horas após administração de 500 µg de Lupron®, além do estradiol de 24 horas, com a evolução clínica das pacientes. Após 6 meses, as pacientes foram divididas em 2 grupos: puberdade progressiva (puberdade precoce verdadeira) e não-progressiva.

O caráter progressivo da puberdade foi avaliado através de parâmetros clínicos (desenvolvimento mamário e pêlos pubianos) e laboratorial (defasagem entre idade óssea e idade cronológica). Para o desenvolvimento mamário, consideraram-se indicativo de puberdade os casos onde as mamas apresentavam estadios maior ou igual a M2 segundo os critérios de TANNER e MARSHALL (1969). Para o desenvolvimento dos pêlos pubianos, consideraram-se indicativo de puberdade os casos com estadios maior ou igual a P2, também segundo os critérios de TANNER e MARSHALL (1969). Além disso, acompanhou-se também o peso e a altura das pacientes em relação à curva de velocidade de crescimento (Anexo 4). A idade óssea foi avaliada pelo método de

GREULICH-PYLE (1959), sendo, então avaliada a defasagem entre a idade óssea e a cronológica.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP, de acordo com o Processo HCRP nº 4112/2005 (Anexo 1). Foi solicitado, aos responsáveis pelas pacientes, autorização para a sua utilização no estudo através de Termo de Consentimento Informado (Anexo 2).

4.2 - Análise estatística

O tamanho da amostra foi baseado a partir da estimativa de uma proporção em uma população, utilizando uma variável dicotômica: $n = (P(1-P)z_{\alpha}^2 / (p-P)^2)$ (ZAR, 1999). Baseando-se em uma proporção de 62,5% de puberdades progressivas (IBANEZ *et al*, 1994) seriam necessários 43 sujeitos para se estimar uma proporção, com erro máximo de 10%, considerando-se a $\alpha=0,05$.

Para a análise estatística foram utilizados os programas *Med Calc version 8.0 for Windows* (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) e *GraphPad Prism version 4.0 for Windows* (GraphPad Software Inc., San Diego, California, U.S.A.). Para análise estatística, utilizou-se curvas ROC (receptor operator characterist) (GREEN e SWETS, 1966), estabelecendo-se sensibilidade, especificidade e melhor nível de corte para o diagnóstico de puberdade precoce verdadeira, para os diferentes critérios analisados. Além disso, avaliou-se a concordância entre os diversos tipos de análise do teste, através do coeficiente kappa (COHEN, 1960). Feito também teste *t* não pareado para análise das médias dos resultados obtidos em ambos os grupos.

5. RESULTADOS

Acompanhou-se durante 6 meses, 44 meninas. As características clínicas das pacientes no momento da avaliação inicial, assim como a idade óssea e o teste do aGnRH, encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2: Dados clínicos e laboratoriais das pacientes

CASO	I. CRONOL.	I. ÓSSEA	MAMAS	PELOS	LH BASAL	LH 3H	FSH BASAL	FSH 3H	E2 24H	EVOLUÇÃO
1	7a9m	10a	3	1	0,11	1,38	0,38	10,4		PNP
2	7a11m	7a10m	2	2	<0,1	2,8	2,5	21,9		PNP
3	1a	1a	2	1	0,15	8,1	7,9	59,4		PNP
4	7a 2m	11a	4	2	1,99	25,9	6,5	24,5	20,1	PNP
5	1a 11m	1a6m	2	1	<0,1	2,8	5,3	48,3	64,9	PNP
6	4a 1m	3a	3	1	0,17	3,7	8,3	52,5	40,6	PNP
7	1a 2m	1a3m	3	1	0,2	4,5	9,3	77,8	54,7	PNP
8	8a7m	10a	1	2	0,14	3,7	3,59	45,8	<20	PNP
9	2a5m	2a8m	3	1	<0,1	3,66	1,8	44,8	<20	PNP
10	7a6m	8a10m	1	3	0,13	2,69	1,94	20,2	20,5	PNP
11	6a8m	6a10m	1	3	<0,1	2,65	1,95	24,4	34,9	PNP
12	1a 10m	1a6m	3	1	0,1	4,1	4,2	40,7	22,7	PNP
13	6a6m	7a10m	1	2	<0,1	1,6	0,8	12,7	77,5	PNP
14	8m	9m	2	1	<0,1	2,3	6,4	72,8	<20	PNP
15	8a4m	11a	2	2	<0,1	1,4	0,7	10,8	26,8	PNP
16	7a 4m	6a10m	2	1	0,1	2,6	3,2	26,4	24,6	PNP
17	7a5m	7a10m	1	2	<0,1	1,1	0,25	4,6	23,6	PNP
18	7a3m	8a10m	2	1	<0,1	1,7	0,32	8,6	106	PNP
19	6a4m	6a10m	2	1	<0,1	3,3	1,4	21,6	33	PNP
20	2a7m	2a6m	3	1	0,13	3,3	3,4	32,2	52,2	PNP
21	11m	11m	2	1	0,11	2,4	2,9	32,1	20	PNP
22	7a4m	8a10m	1	3	<0,1	5,73	0,98	9,65	33,3	PNP
23	6a	6a10m	1	3	0,12	1,81	1,25	12		PP
24	7a10m	11a	4	3	<0,1	4,6	2,49	14		PP
25	7a5m	10a	3	2	0,58	4	7	19,6	21,5	PP
26	7a3m	10a	2	1	0,17	9,3	6,1	58,8	84,6	PP
27	5a7m	6a10m	2	2	<0,1	2,9	1,79	21,9	58,7	PP
28	7a4m	11a	3	2	0,63	10,6	4,86	19	100	PP
29	6a8m	11a	3	3	<0,1	0,14	<0,1	0,39	128	PP
30	7a4m	10a	3	2	0,21	10,5	1,8	15,6	129	PP
31	4a8m	6a10m	2	2	0,11	1,97	1,44	18,5	<20	PP
32	7a9m	8a10m	3	1	<0,1	3,12	1,38	17,7	89,2	PP
33	6a10m	8a10m	1	2	0,24	4,99	1,17	20,9	93,3	PP
34	1a	2a	2	1	0,99	43,5	31	>170	<20	PP
35	7a6m	11a	2	3	0,13	2,9	1,62	13,5	50,6	PP
36	5a10m	6a10m	1	3	<0,1	4,6	1,6	17,9	<20	PP
37	1a2m	1a6m	1	2	0,18	8,4	9,7	72,4	40	PP
38	1a11m	compatível	3	1	0,12	5,8	3,2	63,9	50,5	PP
39	6a5m	7a10m	2	1	<0,1	1,9	1	20,7	62,8	PP
40	7a5m	11a	3	1	0,5	14,9	2,65	17,5	268	PP
41	11m	1a	2	2	0,11	3,4	3,1	31,7	116	PP
42	3a	4a2m	3	2	0,31	27,6	2,73	19,1	117	PP
43	5a5m	6a	3	1	<0,1	8,7	2,85	37	52,9	PP
44	8a1m	11a	2	3	0,17	11	1,5	15,7	<20	PP

PP: puberdade progressiva

PNP: puberdade não-progressiva

Vinte pacientes, ao início do seguimento apresentavam telarca precoce; destas 12 não apresentaram evolução dos caracteres sexuais secundários e 8 evoluíram com progressão destes. Dez, ao início do seguimento apresentavam pubarca precoce; destas 6 não apresentaram evolução dos caracteres sexuais secundários e 4 evoluíram com progressão dos mesmos. Catorze meninas, ao início do seguimento, apresentavam telarca e pubarca precoce; destas 3 não apresentaram evolução dos caracteres sexuais secundários e 11 evoluíram com progressão dos caracteres sexuais secundários (Tabela 3).

Tabela 3 – Desordens do desenvolvimento puberal e sua evolução em 6 meses

Evolução em 6 meses (n)	
Telarca precoce	Puberdade não-progressiva (12)
n=20	Puberdade progressiva (8)
Pubarca precoce	Puberdade não-progressiva (6)
n=10	Puberdade progressiva (4)
Telarca + pubarca precoce	Puberdade não-progressiva (3)
n=14	Puberdade progressiva (11)

As figuras 2, 3 e 4 representam, respectivamente, as curvas ROC do LH de 3 horas, da relação LH/FSH de 3 horas e do estradiol de 24h.

Figura 2 – Curva ROC: LH 3 horas após a injeção de acetato de leuprolida

Figura 3 – Curva ROC: relação LH/FSH 3 horas após a injeção de acetato de leuprolida

Figura 4 – Curva ROC: estradiol 24 horas após a injeção de acetato de leuprolida

Os valores médios da relação da idade óssea sobre a cronológica, LH, FSH, Estradiol e relação LH/FSH estão descritas na tabela 4.

Tabela 4 – Média dos valores analisados nos grupos com puberdade progressiva e puberdade não-progressiva

	Puberdade não progressiva			Puberdade Progressiva			p
	Média	EPM	N	Média	EPM	N	
Relação IO / IC	1,083	0,041	21	1,341	0,046	22	0,0001
LH Basal (mUI/mL)	0,151	0,088	22	0,208	0,054	22	0,5915
LH 3 horas (mUI/mL)	4,155	1,088	22	8,483	2,099	22	0,0742
FSH Basal (mUI/mL)	3,364	0,592	22	4,101	1,369	22	0,6236
FSH 3 horas (mUI/mL)	31,92	4,465	22	31,72	7,598	22	0,9822
LH / FSH Basal	0,0406	0,0182	22	0,0645	0,0138	22	0,3056
LH / FSH 3 horas	0,177	0,0483	22	0,339	0,07	22	0,0639
E2 24 horas (pg/mL)	34,49	6,22	19	73,11	14,17	20	0,0191
Valor de p obtido pelo teste t não pareado							

O LH de 3 horas apresentou para o valor de corte $> 4,5$ mUI/mL, sensibilidade 59,1% e especificidade 86,4%, com área sobre a curva de 0,723. O valor de kappa foi de 0,45, com concordância de 0,73. O estradiol de 24 horas apresentou para o valor de corte $> 40,6$ pg/mL, sensibilidade 70% e especificidade 73,7%, com área sobre a curva de 0,703. O valor de kappa foi de 0,436, com concordância de 0,718. A relação LH/FSH de 3 horas, com valor de corte $> 0,14$, sensibilidade 72,7% e especificidade 77,3%, com

área sobre a curva de 0,771. O valor de kappa foi de 0,5, com concordância de 0,75. (Tabelas 5 e 6).

A relação idade óssea sobre idade cronológica também foi analisada, apresentando para o valor de corte $> 1,21$, sensibilidade 72,7%, especificidade 81% e área sobre a curva de 0,834. O valor de kappa foi de 0,55, com concordância de 0,77. (Tabelas 5 e 6).

Foram também analisados LH e FSH basal, FSH de 3 horas, LH/FSH basal. Os valores encontram-se nas tabelas 4 e 5.

Tabela 5 – Área sobre a curva ROC, valor de corte, sensibilidade e especificidade dos diferentes critérios analisados

	Área sobre a curva	Ponto de corte	Sensibilidade	Especificidade
Idade óssea / idade				
cronológica	0,834	$>1,21$	72,7	81
LH basal	0,658	$>0,15$	45,5	86,4
FSH basal	0,475	>1	90,9	27,3
LH 3 horas	0,723	$>4,5$	59,1	86,4
FSH 3horas	0,586	$\leq 20,9$	68,2	68,2
LH/FSH basal	0,665	$>0,067$	47,6	86,4
LH/FSH 3horas	0,771	$>0,14$	72,7	77,3
E2 24horas	0,703	$>40,6$	70	73,7

Tabela 6 – Tabela de concordância

	Evolução / kappa	Concordância observada
Idade óssea / idade cronológica	0,55	0,77
LH basal	0,32	0,66
LH 3 horas	0,45	0,73
LH/FSH 3 horas	0,50	0,75
Estradiol 24 horas	0,43	0,72

6. DISCUSSÃO

A puberdade precoce verdadeira ou dependente de GnRH tem importantes consequências como a baixa estatura, devida a rápida progressão da idade óssea, além das seqüelas psico-emocionais do desenvolvimento sexual secundário precoce. Daí a importância da realização de um diagnóstico precoce e preciso.

A presença de telarca ou pubarca isoladas deve ser valorizada no momento do diagnóstico de puberdade precoce verdadeira, visto que neste estudo 40% das pacientes que apresentavam estas manifestações isoladas ao início do seguimento, manifestaram, com a evolução, puberdade precoce verdadeira. No entanto, na presença de pubarca e telarca associadas, o desenvolvimento de puberdade precoce verdadeira ocorre na maioria dos casos, como podemos observar neste estudo, com uma frequência de 78% dos casos. O uso de métodos diagnósticos mais eficientes torna-se fundamental para a identificação desses casos, possibilitando uma conduta imediata e levando a um melhor prognóstico com o tratamento.

A administração dos aGnRH levam, inicialmente, a uma hipersecreção de LH e FSH (efeito flare-up), a qual, com o uso contínuo, após um período de cerca de 10 dias, é seguida pela dessensibilização hipofisária e supressão do LH e FSH. Isso decorre de um mecanismo de dessensibilização dos gonadotrofos pela *down regulation* dos receptores de GnRH, levando a uma desregulação da sinalização intracelular (VAN LOENEN *et al*, 2002; ABREU *et al*, 2006). O teste do aGnRH se baseia no efeito ‘flare-up’; assim, em casos onde há ativação do eixo HHO, espera-se que haja um aumento da secreção das gonadotrofinas, após a aplicação deste tipo de medicamento.

O teste com aGnRH tem se mostrado superior ao teste do GnRH para a detecção das pacientes com puberdade precoce de caráter progressivo (IBÁÑEZ *et al* 1994). No trabalho pioneiro (IBÁÑEZ *et al*, 1994), na utilização do aGnRH, os melhores valores de corte para diagnóstico de puberdade precoce verdadeira foram a dosagem de LH de 3

horas > 8 UI/L e de estradiol de 24 horas > 150 pmol/L. Utilizando-se a fórmula de conversão de pmol/L para pg/mL [$E2 \text{ (pg/mL)} \times 3,67 = E2 \text{ (pmol/L)}$], temos que o valor de corte do estradiol de 24 horas foi > 40,87 pg/mL.

Em nossa avaliação, o LH de 3 horas apresentou valor de corte menor que o encontrado por esses pesquisadores, 4,5 mUI/mL. No entanto, o valor de LH de 3 horas, altamente específico, apresentou baixa sensibilidade. Quanto ao estradiol, encontramos valor de corte em 24 horas de 40,6 pg/mL. Este valor de 40,6 pg/mL é concordante com os dados de IBÁÑEZ *et al*, (1994), quando se realiza a conversão do valor do estradiol de pmol/L para pg/mL. O estradiol, por sua vez, embora, mais sensível, mostrou-se menos específico.

Com os ensaios de imunoquimioluminescência de terceira geração, com alta sensibilidade, é possível se detectar níveis discretamente aumentados de gonadotrofinas (NEELY *et al*, 1995). Daí provavelmente a diferença entre o valor de LH encontrado por IBÁÑEZ *et al*, (1994) e aquele encontrado em nosso trabalho, ou seja, é provável que essa diferença seja secundária ao método dosimétrico utilizado, quimioluminescência, ao invés de radioimunoensaio.

Também quando comparado aos ensaios imunofluorimétricos, os ensaios por quimioluminescência mostram-se superiores, sendo capazes de detectar valores menores dos hormônios hipofisários, ou seja, são mais sensíveis e precisos (NEELY *et al*, 1995; RESENDE *et al*, 2007).

Em nossa avaliação, a relação LH/FSH 3 horas, após a administração de aGnRH, mostrou-se superior ao valor de LH de 3 horas ou estradiol de 24 horas, podendo ser considerado o melhor discriminador para o diagnóstico de puberdade precoce verdadeira, com maior sensibilidade (72,7%) e especificidade (77,3%).

Para a obtenção da concordância entre os diversos tipos de análise do teste, usou-se o coeficiente kappa. Este coeficiente expressa mais do que a simples porcentagem de concordância, ele também expressa a concordância esperada por chance. Seu valor varia entre 0 a 1, com o 0 representando nenhuma concordância e o 1 representando perfeita concordância. A força da concordância é diretamente relacionada ao valor do coeficiente kappa: 0-0.20 = Pouca, 0.21-0.40 = Razoável, 0.41-0.60 = Moderada, 0.61-0.80 = Substancial, 0.81-1.0 = Excelente (KHAN e CHIEN, 2001).

Assim, avaliando-se pelo kappa a concordância entre o resultado da relação LH/FSH 3 horas após o teste e a evolução clínica das pacientes quanto ao desenvolvimento de caracteres sexuais secundários, este critério diagnóstico também se mostrou o melhor discriminador da puberdade precoce verdadeira (kappa 0,5 e concordância 0,75).

RESENDE *et al* (2007) comparando os ensaios por quimioluminescência com os imunofluorimétricos na realização do teste do GnRH clássico observou que, em meninas pré-púberes os níveis de LH basal, por quimioluminescência, em 91,3% dos casos encontram-se abaixo de 0,1 UI/L (e em 100% dos casos abaixo de 0,7 UI/L). Considerou, a partir de seus resultados, que valores de LH basal acima de 0,2 UI/L como indicativos de ativação do eixo HHG em meninas. Em nosso trabalho, encontramos como indicativos de puberdade precoce verdadeira valores de LH basal acima de 0,15 mUI/mL.

Neste trabalho, corroborando dados já presentes na literatura (GARIBALDI *et al*, 1993; Ibanez *et al*, 1994), também observamos que, em uma fase inicial da puberdade precoce verdadeira, os ovários já são capazes de produzir quantidades significativas de estradiol, ainda que a secreção de LH mantenha-se baixa (Tabela 2, casos: 23, 27, 29, 32, 35, 39, 41). GARIBALDI *et al* (1993) consideraram que a presença de um aumento marcante na secreção de LH seja um evento tardio na puberdade precoce feminina.

A avaliação ultrassonográfica dos ovários neste estudo teve como finalidade descartar a presença de tumores ovarianos. A presença de folículos ovarianos nestas pacientes não tem sido relatada como critério diagnóstico de ativação do HHO (BUZI *et al*, 1998, CAREL *et al*, 2004).

A avaliação da idade óssea já é conhecida no seguimento do tratamento e da evolução da puberdade precoce (PARTSCH *et al*, 2002). O achado desse estudo demonstra que a idade óssea é também um importante parâmetro para o diagnóstico de puberdade precoce. Assim, outro dado interessante observado foi a análise da relação da idade óssea sobre a idade cronológica na avaliação inicial do diagnóstico. O ponto de corte maior que 1,21, nesta relação, apresentou alta sensibilidade e especificidade comparados a melhor interpretação do teste com aGnRH, que foi a relação LH/FSH após 3 horas da administração da medicação. Outros autores encontraram resultados semelhantes, com valores da relação da idade óssea sobre a cronológica $> 1,2$ associados à puberdade precoce verdadeira (GALLUZZI *et al*, 1998; PARTSCH *et al*, 2002).

Convém ressaltar, entretanto, a única situação em que há desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários sem avanço da idade óssea, podendo haver inclusive atraso desta, o hipotireoidismo (SPEROFF e FRITZ, 2005).

A partir da realização desse estudo podemos ter um melhor uso, avaliação e interpretação dos resultados deste teste em nossa população. Isso nos permite realizar um diagnóstico mais precoce e preciso dessa doença, visando evitar suas possíveis sequelas físicas e psico-emocionais, assim como a realização de tratamentos desnecessários.

Convém ressaltar, entretanto, que nem sempre os achados laboratoriais típicos de puberdade precoce verdadeira estarão presentes em todas as pacientes. Assim, o diagnóstico final depende não só dos dados hormonais como também do quadro clínico como um todo.

7. CONCLUSÕES

1. Os melhores valores de corte do teste do aGnRH foram LH de 3 horas $>4,5$ mUI/mL e estradiol de 24 horas $> 40,6$ pg/mL.
2. O melhor discriminador para o diagnóstico precoce das desordens puberais foi a relação LH/FSH 3 horas após estímulo com aGnRH $> 0,14$.
3. Valores de LH basal acima de $0,15$ mUI/mL são indicativos de puberdade precoce verdadeira.
4. A relação da idade óssea sobre a cronológica > 1.21 deve ser valorizada no momento do diagnóstico.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Abreu LG, Vireque AA, Santos JC, Neto OBP, Silva ACJSR, Sá MFS. Análogos do GnRH: bases moleculares e aplicações em reprodução assistida. *Femina* 2006;34(6):401-8.
2. Amos M, Burgus R, Blackwell R, Vale W, Fellows R, Guillemin R. Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of bovine origin. *Biochem Biophys Res Commun* 1971;44:205-10.
3. Bridges NA, Christopher JA, Hindmarsh PC, Brook CG. Sexual precocity: sex incidence and aetiology. *Arch Dis Child* 1994;70:116-8.
4. Brito VN, Latronico AC, Arnhold IJP, Mendonca BM. A single luteinizing determination 2 hours after depot leuprolide is useful for therapy monitoring of gonadotropin-dependent precocious puberty in girls. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(9):4338-42.
5. Buzi F, Pilotta A, Lombardi A, Zaglio S, Adlard P. Pelvic ultrasonography in normal girls and in girls with pubertal precocity. *Acta Paediatr* 1998;87:1138-45.
6. Carel JC, Lahlou N, Roger M, Chaussain. Precocious puberty and statural growth. *Human Reproduction Update* 2004;10(2):135-47.
7. Carvalho MN, Sá MFS, Silva ACJSR, Nascimento AD, Junqueira FRRJ, Reis RM. Puberdade precoce: a experiência de um ambulatório de Ginecologia Infanto-Puberal. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2007, 29(2):96-102.

8. Cavallo A, Richards GE, Busey S, Michaels SE. A simplified gonadotrophin-releasing hormone test for precocious puberty. *Clin Endocrinol* 1995;42(6):641-46.
9. Choi JH, Shin YL, Yoo HW. Predictive factors for organic central precocious puberty and utility of simplified gonadotropin-releasing hormone tests. *Pediatrics International* 2007;49:806-10.
10. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas* 1960;20:37-46.
11. Cutler GB. Precocious puberty. In: Hurst JW, editor. *Medicine for the Practising Physician*. Butterworth: Woburn; 1988. p.526-30.
12. Eckert KL, Wilson DM, Bachrach LK, Anhalt H, Habiby RL, Olney RC, Hintz RL, Neely EK. A single-sample, subcutaneous gonadotropin-releasing hormone test for central precocious puberty. *Pediatrics* 1996;97:517-9.
13. Galluzzi F, Salti R, Bindi G, Pasquini E, La Cauza C. Adult height comparison between boys and girls with precocious puberty after long-term gonadotrophin-releasing hormone analogue therapy. *Acta Paediatr* 1998;87:521-7.
14. Garibaldi LR, Aceto Jr. T, Weber C, Pang S. The relationship between luteinizing hormone and estradiol secretion in female precocious puberty: evaluation by sensitive gonadotropin assays and the leuprolide stimulation test. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76(4): 851-6.

15. Gonzalez ER. For puberty that comes too soon, new treatment highly effective. JAMA 1982;248:1149-52.
16. Green DM, Swets JM. Signal detection theory and psychophysics. 1966. New York: John Wiley and Sons Inc.
17. Greulich WW, Pyle SI. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. Stanford : Stanford University Press; 1959.
18. Herman-Giddens ME, Slora EJ, Wasserman RC, Bourdony CJ, Bhapkar MV, Koch GC, Hasemeir CM. Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in office practice: A study from the Pediatric Research in Office Settings Network. Pediatric 1997;99:505-12.
19. Ibáñez L, Potau N, Zampolli M, Street ME, Carrascosa A. Girls diagnosed with premature pubarche show an exaggerated ovarian androgen synthesis from the early stages of puberty: evidence from gonadotropin-releasing hormone agonist testing. Fertil Steril 1997;67(5): 849-55.
20. Ibáñez L, Potau N, Zampolli M, Virdis R, Gussinyé M, Carrascosa A, Saenger P, Vicens-Calvet E. Use of leuprolide acetate response patterns in the early diagnosis of pubertal disorders: comparison with the gonadotropin-releasing hormone test. J Clin Endocrinol Metab 1994;78(1): 30-35.
21. Kaplowitz PB, Slora EJ, Wasserman RC, Pedlow SE, Herman-Giddens ME. Earlier onset of puberty in girls: relation to increased mass index and race. Pediatrics 2001;108:347-53.

22. Kappy MS, Ganong CS. Advances in the treatment of precocious puberty. *Advances in Pediatrics* 1994; 41:223-61.
23. Karten MJ, Rivier JE. Gonadotropin-releasing hormone analog design -- structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective. *Endocr Rev* 1986;7:44-66.
24. Khan KS, Chien PF. Evaluation of a clinical test. I: assessment of reliability. *BJOG* 2001;108:562-7.
25. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Archives of Disease in Childhood* 1969;45:13-23.
26. Neely EK, Hintz RL, Wilson D M, Lee PA, Gautier T, Argente J, Stene M. Normal ranges of immunochemiluminometric gonadotropin assays. *J Pediatr* 1995;127:40-6.
27. Oerter KE, Uriarte MM, Rose SR, Barnes KM, Cuthers GBJr. Gonadotropin secretory dynamics during puberty in normal girls and boys. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71(5): 1251-8
28. Partsch CJ, Heger S, Sippell WG. Management and outcome of central precocious puberty. *Clin Endocrinol* 2002;56:129-48.
29. Partsch CJ, Hummelink R, Lorenzen F, Sippell WG. The significance and characteristics of the LHRH test in diagnosing precocious puberty development in girls: the stimulated LH/FSH quotient differentiates between central

- precocious puberty and premature thelarche. *Monatsschr Kinderheilkd* 1989; 137(5):284-8.
30. Pinyerd B, Zipf W B. Puberty-timing is everything! *Journal of Pediatric Nursing* 2005;20(2):75-82.
 31. Reis RM *et al.* Puberdade precoce In: *Ginecologia infanto-puberal*, Ribeirão Preto:São Francisco Gráfica e Editora; 2002 p.11-5.
 32. Resende EAMR, Lara BHJ, Reis JD, Ferreira BP, Pereira GA, Borges MF. Assessment of basal and gonadotropin-releasing-hormone-stimulated gonadotropins by immunochemiluminometric and immunofluorometric assays in normal children. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1424-9.
 33. Schally AV, Nair RM, Redding TW, Arimura A. Isolation of the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone-releasing hormone from porcine hypothalami. *J Biol Chem* 1971;246:7230-36.
 34. Shapiro DB. GnRH antagonists. *Fertil Steril* 2003;80(suppl. 1): S1-S7.
 35. Speroff L, Fritz MA. Abnormal puberty and growth problems. In *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility* (17th ed). Philadelphia,USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p.361-99.
 36. Tanner JM. *Growth at adolescence*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific publications; 1962.

37. van Loenen ACD, Huirne JAF, Schats R, Hompes PGA, Lambalk CB. GnRH Agonists, Antagonists, and Assisted Conception. *Semin Reprod Med* 2002;20(4):349 -64.
38. Zar JH. Biostatistical analysis. 4th Edition. Upper Saddle River, New Jersey, EUA: Prentice-Hall, 1999.

9. ANEXOS

Anexo 1: Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo CEP

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

CAMPUS UNIVERSITÁRIO – MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 27 de abril de 2005

Ofício nº 1158/2005
CEP/SPC

Prezada Senhora:

O trabalho intitulado **“USO DO ANÁLOGO DO GnRH PARA DIAGNÓSTICO DE PUBERDADE PRECOCE”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 200ª Reunião Ordinária realizada em 25/04/2005, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 4112/2005.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
FLÁVIA RAQUEL ROSA JUNQUEIRA(Orientanda)
PROFª DRª ROSANA MARIA DOS REIS(Orientadora)
Depto. de Ginecologia e Obstetria
Em mãos

Anexo 2: Termo de consentimento livre e esclarecido

PROJETO DE PESQUISA

Uso do análogo do GnRH para diagnóstico de puberdade precoce verdadeira

TERMO DE CONSENTIMENTO

As pacientes que farão parte deste projeto de pesquisa apresentam Puberdade Precoce, isto é, apresentam desenvolvimento de mamas e pêlos antes dos 8 anos de idade.

Sua filha está sendo convidada a fazer parte deste estudo.

A Puberdade Precoce leva a baixa estatura nas meninas. Além disso, devido ao desenvolvimento precoce das mamas e pêlos, pode ocasionar dificuldades psicológicas nessas meninas. A forma de parar esse processo é a realização do diagnóstico dessa doença o mais cedo possível, para assim se iniciar o tratamento o quanto antes.

Todas as pacientes com suspeita de puberdade precoce realizarão, como rotina de investigação da doença, os seguintes exames: tomografia computadorizada da cabeça e ultra-som pélvico.

Além disso, com a participação neste estudo, sua filha realizará um exame que faz o diagnóstico da puberdade precoce. Este exame consiste no uso de uma dose subcutânea de uma medicação, o acetato de leuprolida, e na coleta de três amostras de sangue (a primeira minutos antes da medicação, a segunda três horas após e a terceira no dia seguinte). Essa medicação causa a liberação de hormônios sexuais pela hipófise, uma glândula que fica no cérebro. É usada uma dose única e pequena da medicação, que nessas condições não ocasiona efeitos colaterais.

Com a participação neste estudo você e sua filha estarão colaborando para que se realize um diagnóstico mais precoce e adequado deste problema, ajudando outras meninas que também tenham essa doença.

Os esclarecimentos de eventuais dúvidas sobre sua participação neste estudo serão feitos pelos médicos que a acompanharão durante os procedimentos.

Todas as informações sobre os dados de sua filha serão mantidas em sigilo.

Todo e qualquer acompanhamento e assistência para a paciente serão de total responsabilidade dos médicos responsáveis pelo estudo.

Diante de dúvidas, entrar em contato com Dra. Rosana Maria dos Reis ou Dra. Flávia Raquel Rosa Junqueira no telefone 16-6022815, no Laboratório de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HC FMRP-USP.

Em qualquer momento a senhora e sua filha poderão se recusar a continuar fazendo parte deste estudo, e se isto ocorrer, não haverá qualquer restrição em relação aos seus futuros atendimentos neste hospital.

Ribeirão Preto, ____/____/____

Eu, _____, responsável legal pela paciente _____ estou inteiramente de acordo com o exposto acima.

Responsável legal pela paciente

Anexo 3: Estágios de TANNER e MARSHAL (1969)

Anexo 4: Curvas de velocidade de crescimento (TANNER, 1962)