

VINICIUS NAHIME DE BRITO

**Estudo do gene da subunidade alfa-1 do receptor tipo A do
ácido gama-aminobutírico (*GABRA1*) e avaliação
eletroencefalográfica em meninas com puberdade precoce
dependente de gonadotrofinas**

Tese apresentada ao Departamento de
Clínica Médica da Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Latronico

Co-orientadora: Profa. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça

São Paulo

2005

Este trabalho foi realizado na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Dedico este trabalho aos leitores e estudiosos deste assunto fascinante, que é a Puberdade.

Agradeço todos os que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Algumas menções especiais:

Às pacientes e seus familiares, sem a colaboração dos quais não seria possível a realização deste estudo.

À Profa. Dra. Ana Cláudia Latronico, orientadora, admirável pela competência, pela ética, pelo brilho profissional e pessoal e ao mesmo tempo pela perspicácia, simplicidade e pela amizade, tornando o trabalho mais prazeroso. Agradeço especialmente a você pelo incentivo e pela dedicação aos seus alunos e amigos. Outro dia ainda pensei: - que pena que está terminando esta etapa...; e fiz uma avaliação da nossa convivência saudável e proveitosa nestes anos.

À Profa. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça, co-orientadora, percebo que num determinado momento as palavras não expressam minha gratidão pelo apoio, pelo ensinamento, pela oportunidade e pela amizade, resultando numa admiração cada vez maior. Obrigado pelo auxílio e orientação nos inúmeros trabalhos e apresentações, os quais são enriquecidos com suas brilhantes idéias e sugestões.

Ao Prof. Dr Ivo J. P. Arnhold, pelas valiosas discussões científicas e pelo apoio.

À Dra. Ana Elisa Correa Billerbeck, bióloga, pelo auxílio no trabalho de bancada, bem como pela constante disponibilidade em ensinar, e principalmente pela amizade.

À Emília Modolo Pinto, bióloga, além do apoio técnico, pela amizade.

À Dra. Laura Maria de Figueiredo Ferreira Guilhoto, doutora em Neurologia, pelo auxílio na avaliação eletroencefalográfica, bem como pela constante disponibilidade em discutir os laudos e pelas sugestões que contribuíram para o enriquecimento do trabalho.

A Dra. Rosi Mary Grossimann, chefe da Secção de Eletroencefalografia da Divisão de Clínica Neurológica, pela disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Marcello Delano Bronstein, Dra Maria Lucia Cardillo Correa Gianella e ao Dr Luiz Henrique Martins Castro, que constituíram a banca do exame de qualificação, pelas críticas e sugestões.

Ao Prof. Dr. Paulo A Otto, geneticista do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela sua importante colaboração na análise estatística.

Aos Funcionários do Ambulatório da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, representados pelo Sr. José.

Aos Funcionários do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, especialmente as secretárias Francinilda da Silva P. Oliveira (Nildinha), Cristiane Sandri e Ana Lúcia Farah, além da Dona Alzira, Francisca, Cida, Mírian e Cristina.

Aos Colegas pós-graduados: Elaine Costa , Sorahia Domenice, Maria Candida Barisson Villares Fragoso, Tânia Bachega, Luciani Renata Carvalho, Rogerio Santiago, Rafaela Vieira Correa, Regina Martin, Alexander Jorge, pela colaboração e cooperação.

Aos Colegas pós-graduandos: Maria Edna, Karina Berger, Karina Cocco Monteiro Freitas, Márcia Helena, Frederico, Milena Teles, Rocio, Antonio, Catarina, pelo convívio e aprendizado mútuo.

Aos Residentes e estagiários da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia que auxiliaram no atendimento dos pacientes.

Aos amigos, estas pessoas maravilhosas com quem tenho o imenso prazer de conviver: Fernando César Buttignol, pela amizade incondicional, pelo companheirismo; Leila Nascimento, pelo carinho e amizade; Lili, Zezinho, Gabriel e meu afilhado João, pela torcida e pelo apoio.

Aos meus pais e minha família, pelo apoio, compreensão e pela base sustentável na qual mesmo distante tenho sempre como modelo.

Finalmente, para Walt Whitman peço emprestadas algumas palavras:

“Eu ouvi o que os faladores estavam falando

Conversas sobre o início e o fim

Mas não falo sobre o início nem o fim,

Nunca houve mais começo do que há agora

Nem mais juventude ou velhice do que há agora,

E nunca haverá mais perfeição do que há agora,

Nem mais paraíso ou inferno do que há agora...”

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	
Lista de Símbolos	
Lista de Tabelas	
Lista de Figuras	
Resumo	
Summary	
1 . Introdução.....	1
1.1 – Diagnóstico clínico e laboratorial da puberdade precoce dependente de gonadotrofinas	6
1.2 – GABA e puberdade	8
1.3 – A superfamília dos receptores de canais iônicos abertos por ligantes (<i>Ligand-Gated Ion Channel – LGICs</i>).....	12
1.4 – Estrutura molecular do gene da subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA _A	13
1.5 – Puberdade e epilepsia.....	15
1.6 – GABA nos distúrbios puberais e neuropsiquiáticos.....	16
2 – Objetivos.....	19
3 – Métodos.....	20
3.1 – Casuística.....	20
3.2 – Cálculo da taxa de penetrância gênica.....	22
3.3 – Extração de DNA genômico	22
3.4 – Reação de polimerização em cadeia (PCR).....	24
3.5 – Seqüenciamento automático.....	25
3.6. – Predição de mudança do sítio de <i>splice</i>	25
3.7 – Determinação do número de repetições GT do polimorfismo IVS2 –712(GT)n.....	26
3.8 – Digestão enzimática.....	27
3.9 – Estudo eletroencefalográfico.....	28
3.10 – Análise estatística.....	28
4 – Resultados.....	30
4.1 – Forma familiar da Puberdade precoce: freqüência e modo de herança....	30
4.2 – Dados clínicos e laboratoriais.....	30
4.3 – Estudo molecular.....	32
4.4 – Estudo eletroencefalográfico.....	35
5 - Discussão.....	37
6 – Conclusões.....	44
7 – Anexos.....	46
8 - Referências Bibliográficas.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Oligonucleotídeos iniciadores e condições de amplificação por PCR da região codificadora do <i>GABRA1</i>	46
Tabela 2 -	Dados clínicos das meninas com a forma idiopática de PPDG.....	47
Tabela 3 -	Dados hormonais das meninas com a forma idiopática de PPDG.....	49
Tabela 4 -	Genótipo do <i>GABRA1</i> nas meninas com a forma idiopática de PPDG.....	50
Tabela 5 -	Distribuição genotípica e frequência alélica dos polimorfismos exônicos em meninas com a forma idiopática de PPDG e nos controles.....	51
Tabela 6 -	Frequência alélica do polimorfismo IVS2-712(GT) _n nas meninas com a forma idiopática de PPDG e nos controles.....	52
Tabela 7 -	Distribuição genotípica do polimorfismo IVS2-712(GT) _n nas meninas com a forma idiopática de PPDG e nos controles.....	53
Tabela 8 -	Comparação entre os genótipos com e sem o alelo (GT) ₁₂ nas meninas com a forma idiopática de PPDG e nos controles.....	54
Tabela 9 -	Comparação entre os genótipos com e sem o alelo (GT) ₁₇ nas meninas com a forma idiopática de PPDG e nos controles.....	54
Tabela 10 -	Distribuição genotípica e frequência alélica dos polimorfismos intrônicos nas meninas com a forma idiopática de PPDG.....	55
Tabela 11 -	Comparação da distribuição genotípica e da frequência alélica dos polimorfismos do <i>GABRA1</i> entre as pacientes com PPDG com EEG normal e anormal.....	56
Tabela 12 -	Distribuição genotípica do polimorfismo IVS2-712(GT) _n nas pacientes com PPDG com EEG normal e anormal.....	57
Tabela 13 -	Frequência alélica do polimorfismo IVS2-712(GT) _n nas pacientes com PPDG com EEG normal e anormal.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fatores regulatórios da secreção de GnRH.....	58
Figura 2 -	Representação esquemática do <i>GABRA1</i>	59
Figura 3 -	Modelo molecular da subunidade $\alpha 1$ do receptor $GABA_A$	60
Figura 4 -	Heredograma das 3 famílias com as 6 pacientes com a forma idiopática de PPDG.....	61
Figura 5 -	Representação esquemática do <i>GABRA1</i> com a localização dos polimorfismos exônicos e intrônicos do <i>GABRA1</i>	62
Figura 6 -	Polimorfismo exônico silencioso 156T>C.....	63
Figura 7 -	Polimorfismo exônico silencioso 1323G>A	63
Figura 8 -	Digestão enzimática para estudo do polimorfismo 1323 G>A em controles.....	64
Figura 9 -	Estudo do polimorfismo IVS2-712(GT) _n , localizado no íntron 2. Resultados obtidos pelo GeneScan e pelo sequenciamento automático.....	65
Figura 10 -	Artefato <i>in vitro</i> no sequenciamento automático de uma região rica em base timina (T) no íntron 9.....	66
Figura 11 -	EEG - Caso 13.....	67
Figura 12 -	EEG - Caso 19.....	67
Figura 13 -	EEG - Caso 29.....	68
Figura 14 -	EEG - Caso 30.....	68
Figura 15 -	EEG - Caso 14.....	69
Figura 16 -	EEG - Caso 23.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
Asp	Ácido aspártico
C	Citosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio-padrão
EEG	Eletroencefalograma
et al.	e outros
FIE	Fluoroimunoensaio
FSH	Hormônio folículo-estimulante
G	Guanina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABA _A	Receptor tipo A do GABA
<i>GABRA1</i>	Gene que codifica a subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA _A
GAD	Descarboxilase do ácido glutâmico
Gly	Glicina
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
IC	Idade cronológica
IFME	Ensaio imunofluorométrico
IO	Idade óssea
LH	Hormônio luteinizante
LIM	Laboratório de Investigação Médica
Lys	Lisina
NPY	Neuropeptídeo Y
pb	Pares de base
PCR	Reação de polimerização em cadeia
PPDG	Puberdade precoce dependente de gonadotrofinas
RIE	Radioimunoensaio
RNA _m	RNA mensageiro
SNC	Sistema Nervoso Central
T	Timina
Thr	Treonina

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa (A)
β	beta (B)
γ	gama (G)
δ	delta (D)
η	eta (H)
ρ	rô (R)
$>$	maior que
\geq	maior ou igual a
$<$	menor que
\pm	mais ou menos
$\%$	por cento
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
$\mu\text{g/mL}$	micrograma por mililitro
μl	Microlitro
μM	Micromol
mg	Miligrama
mg/mL	miligrama por mililitro
mM	Milimol
ng	Nanograma
pg/mL	picogramas por mililitro
U	Unidade
U/L	Unidades por litro
Kb	Kilobase
p	braço curto do cromossomo (genética)
q	braço longo do cromossomo (genética)

RESUMO

BRITO, V.N. **Estudo do gene da subunidade alfa-1 do receptor tipo A do ácido gama-aminobutírico (*GABRA1*) e avaliação eletroencefalográfica em meninas com puberdade precoce dependente de gonadotrofinas.** [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 75p.

O ácido gama-aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório, está envolvido no mecanismo intrínseco do início da puberdade. Os efeitos inibitórios do GABA sobre a secreção de GnRH (hormônio hipotalâmico estimulador da secreção das gonadotrofinas) são mediados pelo receptor tipo A ($GABA_A$) que é composto por diferentes subunidades organizadas de forma heteropentamérica. A subunidade α_1 , codificada pelo gene *GABRA1* localizado no *locus* 5q34-35, é a mais implicada na atividade inibitória do GABA. A puberdade precoce dependente de gonadotrofinas (PPDG) predomina no sexo feminino, sendo na maioria dos casos idiopática. Recentemente, defeitos moleculares das subunidades dos receptores de GABA têm sido identificados em pacientes com anormalidades eletroencefalográficas específicas. Neste estudo, investigamos a presença de mutações funcionais ou polimorfismos do *GABRA1* em meninas com a forma idiopática de PPDG e avaliamos as anormalidades EEG neste grupo. Trinta e uma meninas com diagnóstico clínico e hormonal da forma idiopática da PPDG, sendo 6 casos familiares (19,4%) e 25 casos esporádicos (80,6%), e 73 controles não relacionados foram selecionados. Todas as pacientes com PPDG apresentaram ressonância magnética de sistema nervoso central normal. Vinte e três meninas foram submetidas a estudo eletroencefalográfico (EEG). O DNA genômico foi extraído do sangue periférico de todas as pacientes e controles. A região codificadora do *GABRA1* foi amplificada utilizando-se oligonucleotídeos intrônicos específicos, seguida por purificação enzimática e seqüenciamento automático. Dois polimorfismos conhecidos do *GABRA1* foram também estudados pelo programa GeneScan e pela técnica de digestão enzimática (enzima *TaI*). O seqüenciamento automático do *GABRA1* não revelou

mutações funcionais. Identificamos 7 polimorfismos no *GABRA1*: duas variantes exônicas 156T>C e 1323G>A, localizados no éxons 4 e 11, respectivamente, e 5 polimorfismos intrônicos - IVS2-712(GT)_n, no íntron 2, caracterizado por número variável de repetições GT; IVS3+12A>T, no íntron 3; IVS8+45T>G no íntron 8; IVS9+76T>G no íntron 9 e IVS10+15G>A, no íntron 10. Estes polimorfismos não alteram o uso do sítio de *splice* original. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a distribuição genotípica e a frequência alélica dos 2 polimorfismos exônicos e do polimorfismo IVS2-712(GT) encontrados no grupo de pacientes e no grupo controle. O EEG revelou anormalidades em 6 de 23 meninas (4 sem epilepsia). A distribuição genotípica e a frequência alélica dos polimorfismos do *GABRA1* não diferiram significativamente entre as pacientes com PPDG sem e com anormalidades eletroencefalográficas. Nós concluímos que mutações funcionais ou polimorfismos no *GABRA1* não estão envolvidos na etiologia da forma idiopática da PPDG e não estão associadas às anormalidades eletroencefalográficas encontradas. Adicionalmente, a presença de alterações eletroencefalográficas em pacientes com PPDG sem epilepsia sugere que a análise eletroencefalográfica deva ser incluída na investigação da PPDG

Descritores: mulheres, adolescência, puberdade precoce; receptores de GABA; polimorfismo; eletroencefalografia.

SUMMARY

BRITO, V.N. **Study of the gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha-1 subunit gene (*GABRA1*) and electroencephalographic analysis in girls with gonadotropin-dependent precocious puberty [thesis]**. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 75p.

The gamma-aminobutyric acid (GABA), a dominant inhibitory neurotransmitter, is involved in the intrinsic mechanism of the onset of the puberty. Their inhibitory effects on the GnRH (hypothalamic gonadotropin release hormone) secretion are mediated by type A receptor (GABA_A), composed by different subunits which are organized in a heteropentameric form. The alpha-1 subunit, encode by *GABRA1* gene located at *locus* 5q34-35, is the most implicated in the inhibitory activity of GABA. The gonadotropin-dependent precocious puberty (GDPP) is predominant in females, being idiopathic in the majority of the cases. Recently, molecular defects of the GABA receptor subunits have been identified in patients with specific electroencephalographic (EEG) abnormalities. In this study, we investigated the presence of functional mutations or polymorphisms of the *GABRA1* in girls with the idiopathic form of the GDPP and evaluated EEG abnormalities in this group. Thirty-one girls with clinical and hormonal diagnosis of GDPP idiopathic form, being 6 familial cases (19.4%) and 25 sporadic cases (80.6%), and 73 unrelated controls were selected. All patients with GDPP had normal magnetic resonance of central nervous system. Twenty-three girls were submitted to electroencephalographic study. Genomic DNA was extracted from peripheral blood of all patients and controls. The entire coding region of the *GABRA1* was amplified using specific intronic oligonucleotides, followed by enzymatic purification and automatic sequencing. Two known polymorphisms of the *GABRA1* were also studied by GeneScan software and digestion with restriction endonuclease *Tail*. The automatic sequencing of the *GABRA1* did not reveal any functional mutations. We identified 7 polymorphisms in the *GABRA1*: two silent exonic variants 156T>C e 1323G>A, located at exons 4 e 11, respectively, e 5

polymorphisms - IVS2-712(GT)_n, at intron 2, characterized by a variable number of repeat GT; IVS3+12A>T, at intron 3; IVS8+45T>G at intron 8; IVS9+76T>G at intron 9 and IVS10+15G>A, at intron 10. These polymorphisms did not alter the use of original splicing site. No significant statistical difference of the genotypic distribution and allele frequency of the exonic polymorphisms (156T>C and 1323G>A) and IVS2-712(GT)_n between unrelated patients and control group was obtained. Electroencephalographic tracings were abnormal in 6 of 23 girls (4 without epilepsy). No significant statistical difference of the genotype distribution and allele frequency were found between patients without and with EEG abnormalities. We conclude that functional mutations or polymorphisms in the *GABRA1* are not involved in the etiology of idiopathic GDPP in this study, and they are not associated with electroencephalographic abnormalities. In addition, EEG abnormalities present in girls with GDPP without epilepsy, suggest that EEG analysis should be included in the investigation of the precocious puberty.

Key words: women, female adolescents; precocious puberty; GABA receptor; polymorphism; electroencephalograph

1 - INTRODUÇÃO

A puberdade compreende o período de transição entre a infância e a idade adulta quando ocorrem os caracteres sexuais secundários, o estirão do crescimento, a produção dos gametas maduros (esperma ou oócito) com conseqüente aquisição da função reprodutiva^{1,2}. Estas mudanças físicas são acompanhadas de relevantes alterações psicológicas. A puberdade tem início a partir do aumento da amplitude da secreção pulsátil do hormônio decapeptídeo de origem hipotalâmica, liberador de gonadotrofinas (GnRH), que estimula a secreção hipofisária das gonadotrofinas - LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo-estimulante). O LH, considerado o principal hormônio da puberdade, exerce os seus efeitos através do seu receptor, estimulando a síntese e a secreção dos esteróides gonadais: testosterona nos testículos e estradiol nos ovários¹.

No período fetal e pós-natal, a elevada atividade do eixo gonadotrófico, caracterizada pela alta secreção pulsátil do GnRH e conseqüentemente das gonadotrofinas, é seguida por um período de baixa atividade na infância, o chamado período quiescente. Posteriormente, a reativação da secreção de GnRH desencadeia o processo puberal¹⁻³. O mecanismo responsável pela inibição do pulso gerador de GnRH durante a infância e sua posterior reativação tem sido objeto de vários estudos experimentais e clínicos.

Duas hipóteses têm sido propostas para explicar o mecanismo de início do processo puberal. A primeira hipótese foi proposta por Dohrn e

Hohlweg^{3,4} e baseia-se na observação de que doses pequenas de estrógenos podem suprimir o aumento das gonadotrofinas em ratos imaturos após castração. De acordo com esta hipótese, a puberdade inicia-se quando o sistema envolvido na secreção de gonadotrofinas torna-se menos sensível a inibição por retro-alimentação dos esteróides, permitindo a secreção de LH e FSH. A segunda hipótese, atualmente a mais aceita, envolve a inibição central da secreção de GnRH independente da inibição exercida pelos esteróides gonadais^{3,5}. Esta hipótese baseia-se no fato de que a secreção das gonadotrofinas em macacos submetidos a gonadectomia e em humanos portadores de disgenesia gonadal está elevada durante o período neonatal, mas sofre posterior supressão e permanece reduzida até o início da puberdade. Medidas diretas do GnRH na eminência média de macacos *Rhesus* também reforçam esta hipótese⁶. Portanto, o início da puberdade é dependente de um mecanismo central que controla a secreção pulsátil do GnRH.

Vários neurotransmissores e neuromoduladores apresentam propriedades excitatórias e/ou inibitórias sobre a secreção de GnRH^{1,3}. O ácido gama-amino butírico (GABA), neuropeptídeo Y (NPY), opióides endógenos, β endorfinas e melatonina são os principais neurotransmissores inibitórios, enquanto a glicina, glutamato, norepinefrina, dopamina, prostagandinas, serotonina, fatores de crescimento derivados da glia, tais como TGF α e β (fatores de crescimento de transformação), IGF-1 (fatores de crescimento insulina-símile) e EGF (fator de crescimento epidérmico) são primariamente excitatórios³.

A leptina, hormônio secretado principalmente pelos adipócitos, tem sido implicada no início da puberdade humana^{1,7}. No entanto, as evidências obtidas através dos estudos em modelos animais e em humanos apontam para um papel permissivo deste hormônio no eixo reprodutivo. A leptina atua como mediadora do tônus de GnRH, e não como desencadeadora do processo puberal^{2,7}. As principais evidências que favorecem o papel mediador da leptina são: 1- não ocorre uma aumento na leptina circulante no início da puberdade^{1,8}, 2 - em meninas pré púberes e no início da puberdade, o aumento dos níveis de leptina não correlaciona-se com o aumento nos níveis de estradiol^{1,9}, 3 - no atraso constitucional do crescimento e puberal, um aumento nos níveis de leptina não é essencial para o início da puberdade^{1,10}, 4 - no diabetes lipopatrófico congênito, apesar da ausência de tecido adiposo visceral e subcutâneo e consequentemente, hipoleptinemia severa, a puberdade pode ocorrer na idade normal e a fertilidade é relatada^{1,11}. Por outro lado, em situações de deficiência severa de leptina, alguns relatos atribuem um papel fundamental da leptina no início do processo puberal: a deficiência congênita de leptina ou a resistência a leptina devido a mutações no gene da leptina ou no seu receptor, respectivamente, são associadas a atraso puberal e hipogonadismo hipogonadotrófico^{1,12,13}. Os fatores regulatórios da secreção de GnRH nas diferentes fases do desenvolvimento estão sumarizados na Figura 1.

A idade cronológica de início da puberdade relaciona-se com a duração do período de baixa atividade do eixo gonadotrófico na infância, ou seja, quanto menor a duração deste período, mais precoce será o início do

processo puberal^{1,2}. O período de início da puberdade humana está relacionada com fatores ambientais, sócio-culturais, étnicos e econômicos¹⁴. No entanto, evidências recentes apontam para uma influência genética no início da puberdade, dentre elas: a correlação entre a idade de menarca entre mãe e filha; a variação entre os diferentes grupos raciais e os estudos em gêmeos demonstrando que os eventos puberais ocorrem com maior concordância cronológica entre gêmeos monozigóticos do que em dizigóticos^{14,15}. Entretanto, a modulação genética da idade de início da puberdade provavelmente decorre do efeito aditivo de múltiplos genes, não exibindo um padrão clássico de herança Mendeliana¹⁴.

Uma recente análise de 156 casos de puberdade precoce dependente de gonadotrofinas (PPDG) (147 meninas e 9 meninos) revelou que 43 destes casos (42 meninas e 1 menino) (27,5%) eram de origem familiar. A análise da segregação nestas famílias sugeriu um modo de herança autossômica dominante com penetrância incompleta, sexo-dependente¹⁶.

Inúmeros defeitos monogênicos implicados nos distúrbios puberais têm sido descritos, explicando algumas condições de precocidade e de atraso puberal¹⁷. Mutações nos genes do receptor de LH, da 21-hidroxilase, 11-hidroxilase, 3 β -hidroxiesteróide-desidrogenase, aromatase, do receptor de glicocorticóide e no gene da subunidade α da proteína Gs, presente na síndrome de McCune-Albright são os principais defeitos envolvidos na etiologia da precocidade sexual¹⁷. No atraso puberal, têm sido descritas mutações nos genes *KAL-1* (Síndrome de Kallmann), *DAX-1*

(hipoplasia adrenal congênita), *SF-1* (fator esteroidogênico-1), *PC-1* (pro hormônio convertase-1), da leptina, do receptor do GnRH, *PROP-1* (na deficiência hipofisária combinada), FSH β (subunidade β do receptor de FSH), FSHR (receptor de FSH), LH β (subunidade β do receptor de LH), LHR (receptor de LH), da aromatase, da 5 α redutase, do receptor estrogênico e do receptor androgênico, e mais recentemente no gene *GPR 54*^{17,18}.

Embora tais defeitos monogênicos expliquem alguns casos de precocidade sexual independente de gonadotrofinas (PPIG) ou pseudo puberdade precoce, a etiologia da puberdade precoce dependente de gonadotrofinas (PPDG) ou puberdade precoce central, situação na qual o eixo gonadotrófico apresenta reativação precoce, permanece desconhecida. Hamartomas hipotalâmicos, lesões tumorais, infecções, traumas e irradiação do SNC, são fatores conhecidos na ativação precoce do eixo gonadotrófico¹⁹. No entanto, a maioria (80%) não apresenta causa orgânica detectável e é classificada como idiopática¹⁹. Considerando que fatores genéticos estão implicados nesta etiologia, torna-se necessária a compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação da secreção de GnRH. Nessa direção, estudos de alguns genes candidatos para explicar esta patologia têm sido de interesse crescente¹⁴.

Historicamente, o primeiro gene examinado neste contexto foi o do próprio GnRH (*GnRH-I*). Concluiu-se que a regulação transcricional do GnRH-I não tem papel crítico no início da puberdade². O conceito de que as anormalidades em qualquer um dos sistemas de neurotransmissores e de seus receptores que influenciam a secreção do GnRH podem induzir o

desenvolvimento sexual precoce levou posteriormente a investigação destes neurotransmissores que regulam a secreção de GnRH, principalmente GABA e neuropeptídeo Y (NPY), sendo então objeto de intensa investigação em modelos animais^{1-3,20-22}. Os resultados evidenciam o papel de ambos na secreção de GnRH. A utilização de bloqueadores de receptores específicos tanto do GABA quanto do NPY provocou aumento da secreção de GnRH e consequentemente desenvolvimento de puberdade^{20,22}. Estes resultados indicam que o GABA e o NPY são fundamentais na redução da atividade e inibição do eixo gonadotrófico na fase pré puberal.

1.1 - Diagnóstico clínico e laboratorial da puberdade precoce dependente de gonadotrofinas

O diagnóstico clínico da precocidade sexual é baseado na idade de aparecimento e desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários em ambos os sexos. É considerada precoce, a puberdade que se inicia antes dos 8 anos nas meninas e dos 9 anos nos meninos¹⁹. A história clínica deve enfatizar a cronologia e a velocidade de aparecimento dos caracteres sexuais secundários, o uso de medicamentos por via oral ou tópica, história de trauma crânio encefálico, infecções do SNC, ocorrência de menarca no sexo feminino, bem como uma história familiar detalhada sobre o processo puberal dos pais e parentes mais próximos.

Ao exame físico, os dados antropométricos (peso, altura, desvios-padrão em relação à média para a idade cronológica) são avaliados e o

estadiamento dos caracteres sexuais secundários baseia-se nos critérios de Tanner & Marshall^{23,24}.

O diagnóstico laboratorial objetiva diferenciar a forma dependente da independente de gonadotrofinas através da demonstração da ativação ou não do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Com a utilização de métodos laboratoriais mais sensíveis e específicos, como o método imunofluorométrico (IFME), a dosagem de gonadotrofinas, principalmente do hormônio luteinizante (LH), em condição basal permite o diagnóstico de ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal em ambos os sexos. No entanto, valores de LH em condição basal em nível pré-puberal não afastam a possibilidade de ativação do eixo, tornando necessária a realização do teste de estímulo com GnRH exógeno²⁵.

Na avaliação por imagem, o raio X de punho e mão esquerda para avaliação da idade óssea, ultrassom pélvico e ressonância magnética do sistema nervoso central (SNC) são úteis no diagnóstico da puberdade precoce e contribuem na monitorização das pacientes¹⁹.

A monitorização do tratamento da PPDG com análogos de GnRH é feita pelo exame clínico a cada 3 meses, pelas dosagens de LH em condição basal e/ou após estímulo com GnRH clássico ou após análogo de GnRH depot, avaliação da velocidade de crescimento, progressão da idade óssea e previsão da estatura final¹⁹.

1.2 - GABA e puberdade

GABA é considerado o principal neurotransmissor com ação inibitória dominante no hipotálamo médio basal¹⁻³. Neurônios pré sinápticos sintetizam o GABA a partir da descarboxilação do glutamato na presença da descarboxilase do ácido glutâmico (GAD). O GABA é estocado em vesículas e secretado por exocitose na presença de cálcio extracelular³. Duas formas de GAD com diferente peso molecular são identificadas: GAD67 e GAD65, e são codificadas por dois genes distintos^{3,26}. Ambas as formas de GAD estão presentes em várias regiões do cérebro, porém com distribuição variável²⁷.

Três diferentes receptores do GABA (A, B e C) foram identificados no cérebro³. Os receptores GABA_A e GABA_C estão localizados na membrana e pertencem a superfamília dos receptores de canais iônicos abertos por ligante (*Ligand-Gated Ion Channel - LIGCs*), enquanto o receptor GABA_B está acoplado aos canais de cálcio e potássio e às proteínas guanosina-trifosfato (GTP)³. O receptor GABA_C é um canal de cloro sendo identificado predominantemente na retina de vertebrados³.

Os receptores GABA_A são os mediadores da inibição exercida pelo GABA na secreção do GnRH, sendo portanto, particularmente importante na determinação do início da puberdade^{3,28}. A inibição GABAérgica no período da infância ocorre por um mecanismo direto sobre os neurônios secretores de GnRH que possuem receptores GABA_A, e principalmente de forma indireta através da inibição dos neurônios

glutamatérgicos que são primariamente excitatórios sobre os neurônios secretores de GnRH^{1,3}. Conseqüentemente, no período pré puberal observa-se uma baixa liberação de GnRH.

A ligação do GABA ao seu receptor promove um influxo de cloro (Cl⁻) que causa hiperpolarização do neurônio secretor de GnRH e conseqüente inibição da atividade neuronal³.

Os receptores GABA_A são canais iônicos permeáveis ao cloro, e em menor escala, ao bicarbonato. A ação de GABA nos receptores GABA_A depende do potencial de ação da membrana e da concentração do cloro intracelular. Este último evento está sob regulação de um mecanismo homeostático do cloro³. Na maioria dos neurônios maduros, a baixa concentração intracelular de cloro (<10 nM) é mantida por um co-transportador de cloro neurônio-específico acoplado ao potássio, KCC-2, o qual é amplamente expresso no cérebro adulto, mas pouco expresso em cérebro fetal/neonatal²⁹⁻³¹.

DeFazio et al.²⁹, examinaram o efeito direto do GABA sobre os neurônios secretores de GnRH, e definiram a expressão dos co-transportadores envolvidos na homeostase do cloro. Em contraste com outros trabalhos³², os autores concluíram que a ativação sináptica dos receptores GABA_A tem efeito excitatório sobre os neurônios secretores de GnRH que contêm uma elevada concentração intracelular de cloro decorrente da expressão de NKCC1 (co-transportador acumulador de Cl⁻), e pela ausência do transportador de cloreto que causa a extrusão desse ânion, como o CLC-2 e KCC-2. Os neurônios de GnRH também expressam o

receptor GABA_B, sendo este tipo de receptor capaz de mediar, de forma direta e potente, os impulsos inibitórios GABAérgicos sobre a atividade do neurônio de GnRH. Uma interação de duas forças opostas, uma excitatória mediada pelos receptores GABA_A e outra inibitória mediada pelos receptores GABA_B seria responsável pela regulação homeostática da secreção de GnRH. A ação inibitória induzida pela ativação dos receptores GABA_A sobre a secreção de GnRH, deve ser consequência da ação inibitória do GABA sobre o sistema neuronal excitatório conectado transinapticamente aos neurônios de GnRH²⁹.

Até o momento, são conhecidas 18 subunidades geneticamente diferentes (α 1-6, β 1-4, γ 1-4, δ , η , ρ 1-2) que participam da composição do receptor GABA_A³. O receptor GABA_A apresenta estrutura heteropentamérica, ou seja, cinco diferentes subunidades agrupadas formando um canal iônico¹⁻³. A forma mais expressa no SNC é a α 1 β 2 γ 2 que está organizada na razão 2:2:1^{2,3}. As características funcionais e farmacológicas do receptor GABA_A são determinadas pela composição das subunidades. A distribuição das subunidades no cérebro difere durante os períodos de desenvolvimento pré-natal e pós-natal. A expressão da subunidade γ 2 está muita elevada antes do nascimento e sofre redução gradual após o nascimento, enquanto a expressão da subunidade α 1 é mínima antes do nascimento e aumenta gradualmente após o nascimento até a idade adulta. De fato, os receptores GABA_A contendo a subunidade α 2 são substituídos pelos receptores contendo a subunidade α 1 durante o período pós natal nos cérebros de ratos, de macacos e em humanos, e portanto o aumento da subunidade α 1

indica a maturação cerebral e o início da inibição sináptica exercida pelo GABA^{3,32}. Portanto, a subunidade $\alpha 1$ que compõe o receptor GABA_A é a mais implicada na inibição sináptica exercida pelo GABA.

Em macacos *Rhesus* do sexo feminino, o papel do GABA como importante inibidor da secreção de GnRH foi demonstrada pelas seguintes observações: 1- a secreção de GABA no SNC está reduzida no início da puberdade^{21,33}; 2- a infusão de GABA no SNC suprime a secreção de GnRH apenas no início da puberdade³³; 3- a infusão de bicuculine, um antagonista do receptor GABA_A, ou de oligonucleotídeos antisense para o RNAm do GAD no SNC estimula a secreção de GnRH em macacos prépuberes^{21,33} 4- a infusão crônica de bicuculine na base do terceiro ventrículo induz a puberdade precoce²⁰. Em contraposição aos achados descritos acima, ElMajdoubi et al.¹⁹ recentemente demonstraram que o RNAm do GAD não sofre alterações antes do início da puberdade em macacos do sexo masculino, sugerindo que a síntese do GABA não difere nos períodos pré puberal e puberal no sexo masculino. Este dado reforça o dimorfismo sexual no papel do GABA como inibidor da secreção pulsátil do GnRH. As evidências sugerem que o GABA exerce um papel proeminente na regulação da secreção do GnRH no sexo feminino, enquanto que o NPY seria mais importante no sexo masculino².

Estudos experimentais demonstraram que um aumento coordenado da atividade glutamatérgica sobre os neurônios secretores de GnRH, através do receptor específico N-metil D-aspartato (NMDA) acompanhado da diminuição do tônus GABAérgico sobre os mesmos

neurônios induz o aumento da secreção de GnRH levando ao início do processo puberal^{1-3,32}. Entretanto, outros peptídeos e neurotransmissores, tais como NPY, glicina, norepinefrina, endorfinas, TGF α e β participam simultaneamente da complexa regulação da reativação da secreção pulsátil do GnRH. Devido ao fato de vários genes no SNC estarem sendo ativados e desativados estabelecendo uma complexa cascata de eventos, é possível que “*genes mestres*” ainda desconhecidos controlem o início da puberdade normal³.

1.3 - A superfamília dos receptores de canais iônicos abertos por ligante (*Ligand-Gated Ion Channel – LGICs*)

A superfamília dos receptores de canais iônicos abertos por ligantes é constituída pelos receptores nicotínicos, pelo receptor 5-HT₃ de serotonina, pelos receptores GABA_A e GABA_C, pelos receptores de glutamato e de glicina³⁴. São receptores de membrana, formados por pentâmeros que são constituídos por subunidades homólogas, ou seja, todos os genes que codificam as subunidades são presumivelmente derivados de um gene ancestral comum^{35,36}. Cada subunidade pode ser subdividida em um extenso domínio extracelular amino terminal, seguido por quatro domínios transmembrana, sendo que entre o terceiro e o quarto domínios, uma alça intracelular de comprimento variável está presente, e finalmente uma porção carboxi terminal intracelular³⁴. A hierarquia da família

dos receptores de acordo com o ligante endógeno é sumarizada no quadro abaixo ³⁴:

Superfamília dos receptores nicotínicos

Família dos receptores nicotínicos

Subfamília dos receptores endoteliais

Subfamília dos receptores neuronais sensíveis a α -bungarotoxina

Subfamília dos receptores musculares

Subfamília dos receptores neuronais heteroméricos

Subfamília dos receptores neuronais protostomianos

Família dos receptores de serotonina

Família dos receptores de GABA

Subfamília dos receptores de GABA_A

Subfamília dos receptores de GABA_C

Família dos receptores agonistas variáveis

Subfamília dos receptores de GABA

Subfamília dos receptores de glutamato

Subfamília dos receptores de glicina

Superfamília dos receptores excitatórios de glutamato

Família dos receptores excitatórios de glutamato

Subfamília das subunidades de receptores NMDA

Subfamília de subunidades de receptores de AMPA

Subfamília de subunidades de receptores Kainato

Subfamília de proteínas ligadoras ao kainato

Subfamília de subunidades delta

Superfamília dos receptores ATP

Família dos receptores ATP

1.4 Estrutura molecular do gene *GABRA1* e da subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA_A

Em 1989, Buckle et al.³⁷ mapearam duas das isoformas da subunidade α do receptor de GABA (*GABRA1* e *GABRA2*) nas regiões

5q34-35 e 4p13-p12, respectivamente. Em 1992, Johnson et al.³⁸, confirmaram a localização do *GABRA1* na porção distal 5q. Dez anos após o mapeamento da isoforma da subunidade do receptor, Russek³⁹ caracterizou o *GABRA1*, como membro de um *cluster* de genes distribuídos em aproximadamente 480 Kb no cromossomo 5q 34.

O gene *GABRA1* é constituído de 11 éxons (www.ncbi.nlm.nih.gov - NT_023133), sendo que os éxons 3 a 11 codificam uma proteína de membrana de 456 aminoácidos. Esta proteína é constituída por uma ampla região aminoterminal extracelular, 4 domínios transmembrana (TM1, TM2, TM3 e TM4) e uma curta região intracelular carboxiterminal. O domínio extracelular contém uma região altamente conservada, chamada alça de Cys. Os domínios TM3 e TM4 são ligados por uma alça citosólica de comprimento variável. Todas estas características são encontradas nos receptores nicotínicos de acetilcolina, receptores de glicina e de serotonina, que pertencem à mesma superfamília³⁴. A representação esquemática do *GABRA1* está apresentada na Figura 2.

Recentemente, Kash et al.⁴⁰ demonstraram que o perfeito funcionamento do receptor GABA_A depende de interações eletrostáticas entre os resíduos Asp57 e Asp149 carregados negativamente e localizados nas alças extracelulares 2 e 7, e o resíduo Lys279 carregado positivamente e localizado na região 2-3L do domínio transmembrana da subunidade $\alpha 1$. Durante o acoplamento ligante-receptor, os aminoácidos Asp149 e Lys279 parecem moverem-se e aproximarem-se um do outro, provendo um mecanismo potencial para o acoplamento ideal do ligante (GABA) e abertura

do canal iônico. O modelo computacional da estrutura terciária da subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA_A está representado na Figura 3.

1.5 – Puberdade e Epilepsia

A relação entre epilepsia e alterações endocrino-reprodutivas foi registrada primeiramente na literatura por Locock, em 1857, por Gowers, em 1893, e um pouco mais tarde, por Turner, em 1907⁴¹. Esses autores observaram que, em meninas, havia uma tendência de início da epilepsia com a puberdade assim como de reinício de crises convulsivas durante a puberdade. A associação entre puberdade precoce e epilepsia também foi previamente relatada^{42,43}. É possível que o aumento dos esteróides gonadais possa sensibilizar neurocircuitos envolvidos na epileptogênese, mas também se especula que a desinibição GABAérgica que ocorre no início da puberdade possa estar envolvido na precocidade sexual e na gênese da epilepsia^{3,42,43}.

Dois trabalhos da literatura que avaliaram o estudo eletroencefalográfico de crianças com precocidade sexual são intrigantes. Primeiramente, em 1965, Liu et al.⁴⁴ demonstraram anormalidades eletroencefalográficas em 81% de pacientes com a forma idiopática da PPDG caracterizadas por paroxismos e/ou atividade cerebral lenta de caráter difuso. Posteriormente, Theodore et al.⁴⁵ estudando 19 crianças com precocidade sexual, encontraram anormalidades eletroencefalográficas em

36,8% delas, também caracterizadas por paroxismos e ondas lentas difusas⁴⁵.

Sendo o eletroencefalograma (EEG) uma técnica não invasiva que avalia a atividade elétrica do córtex cerebral e de forma indireta a atividade dos neurotransmissores, incluindo a atividade GABAérgica^{46,47}, mais recentemente alguns trabalhos relacionam anormalidades eletroencefalográficas com alterações específicas nos receptores GABAérgicos⁴⁸.

A relação entre as anormalidades eletroencefalográficas descritas nas crianças com precocidade sexual e possíveis defeitos genéticos envolvendo as subunidades dos receptores GABA_A poderiam justificar ambos os achados e consiste numa estratégia interessante e original de investigação.

1.6 –GABA nos distúrbios puberais e neuropsiquiátricos

Algumas evidências clínicas suportam o papel do GABA como um dos reguladores da secreção de GnRH. Bourguignon et al.⁴⁹, em 1997, descreveram um caso clínico de uma menina de 11 meses com hiperglicinemia não cetótica, anormalidade metabólica resultante de um defeito genético na metabolização da glicina, que apresentava crises convulsivas e desenvolveu puberdade precoce que envolveu após o uso de loreclezol e vigabatrina, ambos agonistas GABAérgicos. Estudos *in vitro* em células imortalizadas de hipotálamo de ratos evidenciaram que elevadas

concentrações de glicina aumentaram a secreção do GnRH⁴⁹. Loreclezol e vigabatrina além de controlar as crises convulsivas, suprimiram o aumento na frequência da secreção pulsátil de GnRH⁴⁹. Estas observações sugeriram que tanto a glicina, um neurotransmissor excitatório da secreção de GnRH, como o GABA, um neurotransmissor inibitório estão envolvidos no início do processo puberal⁴⁹.

Puberdade atrasada tem sido observada em meninos epiléticos tratados com valproato de sódio, uma droga com atividade GABAérgica^{3,50,51}. No entanto, a farmacologia do valproato de sódio é complexa e há outros relatos de que esta e outras drogas anti-epiléticas não retardam o início da puberdade^{3,50}.

O tratamento da epilepsia com agonistas GABAérgicos (valproato de sódio) em mulheres jovens resultou em maior incidência de síndrome dos ovários policísticos (SOP) com secreção elevada de testosterona^{3,52}. Considerando que a SOP ocorre habitualmente durante o período puberal, especula-se que a irregularidade na secreção de GnRH desencadeada pela desinibição GABAérgica pode estar envolvida na gênese da SOP^{3,52}.

Variantes alélicas no *GABRA1* têm sido associadas a doenças neuropsiquiátricas. Horiuchi et al.⁵³ examinaram o *GABRA1* como um candidato para explicar os distúrbios de humor de origem genética. Os polimorfismos, IVS2-712(GT)_n, localizado no íntron 2 e caracterizado por um número variável de repetições GT, e o 156T>C, localizado no éxon 4, foram relacionados com distúrbios bipolares. Este estudo indicou que variantes

alélicas do *GABRA1* podem conferir susceptibilidade genética a distúrbios neuropsiquiátricos.

Com base nestes achados, nós hipotetizamos que mutações inativadoras ou variantes alélicas no *GABRA1* possam comprometer a ação inibitória do GABA sobre a secreção hipotalâmica do GnRH ou conferir graus variáveis de susceptibilidade ao fenótipo de puberdade precoce dependente de gonadotrofinas (PPDG). Adicionalmente, tais anormalidades genéticas, se encontradas poderiam estar envolvidas na gênese das anormalidades eletroencefalográficas nestas pacientes.

2 - OBJETIVOS

- 1- Estabelecer a frequência e o modo de herança da forma familiar idiopática de PPDG.
- 2- Analisar a região codificadora do gene da subunidade $\alpha 1$ do receptor $GABA_A$ (*GABRA1*), em meninas portadoras da forma idiopática de PPDG.
- 3- Estabelecer e comparar as frequências alélica e genotípica de polimorfismos exônicos identificados no *GABRA1* em meninas com a forma idiopática de PPDG e em um grupo controle.
- 4- Estabelecer e comparar as frequências alélica e genotípica do polimorfismo (IVS2-712(GT)n) no íntron 2 do *GABRA1* em meninas com a forma idiopática de PPDG e em um grupo controle.
- 5- Avaliar o padrão eletroencefalográfico das meninas com a forma idiopática de PPDG.
- 6- Estabelecer e comparar as frequências alélica e genotípica dos polimorfismos identificados no *GABRA1* entre as meninas com a forma idiopática de PPDG sem e com anormalidades eletroencefalográficas.
- 7- Correlacionar os achados moleculares do *GABRA1* com o fenótipo das pacientes com puberdade precoce.

3 - MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP/ aprovação nº1498/02) e o consentimento formal foi concedido pelas pacientes ou responsável.

3.1 - Casuística

Foram selecionados 31 pacientes do sexo feminino, portadoras da forma idiopática da PPDG acompanhadas no Ambulatório de Endocrinologia do Desenvolvimento do HCFMUSP e 73 controles do sexo feminino. Os critérios clínicos e laboratoriais considerados para inclusão das pacientes com a forma idiopática de PPDG no estudo foram: início dos caracteres sexuais secundários antes dos 7 anos, concentrações de LH em condição basal e/ou após estímulo com GnRH exógeno na faixa puberal, ressonância magnética do SNC sem anormalidades, e resposta terapêutica satisfatória ao tratamento com análogos de GnRH depot (acetato de leuprolide 3,75 mg, via subcutânea, a cada 28 dias). Duas pacientes eram portadoras de epilepsia generalizada idiopática, diagnosticada na infância, e já estavam em tratamento no ambulatório de Neurologia do HCFMUSP em uso de drogas antiepiléticas (carbamazepina e ácido valpróico). As dosagens hormonais e o estudo molecular foram realizados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 do HCFMUSP.

O diagnóstico laboratorial baseou-se nas dosagens basais de gonadotrofinas (LH e FSH), principalmente do LH. O teste de estímulo com GnRH de ação curta foi realizado em todas as pacientes pela administração de 100 mcg de gonadorelina i.v. no tempo zero e coleta de sangue nos tempos -15, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos. As dosagens de LH e FSH foram realizadas utilizando ensaio imunofluorométrico (IFME), exceto numa paciente que teve as dosagens realizadas utilizando radioimunoensaio (RIE); as dosagens de estradiol foram realizadas utilizando fluoroimunoensaio (FIE) ou radioimunoensaio (RIE). Os critérios para definir ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, e conseqüentemente diagnosticar PPDG, foram: LH basal $>0,6$ U/L e/ou pico de LH $> 6,9$ U/L para o método IFME²⁵ e pico de LH > 15 U/L para o método RIE após estímulo com GnRH exógeno⁵⁴, ou alternativamente LH >10 U/L dosado 2 hs após a administração da primeira ampola de acetato de leuprolide 3,75mg, via subcutânea⁵⁵.

A avaliação da boa resposta terapêutica foi evidenciada pelo exame clínico trimestral e pela a monitorização laboratorial com dosagens das gonadotrofinas e estradiol em condição basal e após estímulo com GnRH exógeno ou após análogo de GnRH depot. Os critérios utilizados para considerar bom controle hormonal foram: LH basal $<0,6$ U/L, LH pico após estímulo com GnRH clássico $<2,3$ U/L ou LH $<6,6$ U/L 2 hs após acetato de leuprolide depot⁵⁵. A idade óssea foi estimada utilizando o método de Greulich-Pyle⁵⁶. A ultrassonografia pélvica foi realizada no momento do diagnóstico e semestralmente durante o tratamento com análogo de GnRH depot.

O grupo controle foi composto de mulheres brasileiras jovens cuja idade da menarca ocorreu após os 10 anos ¹⁵. Antecedentes neurológicos ou doenças crônicas foram critérios de exclusão.

3.2 - Cálculo da taxa de penetrância

O critério para classificar como forma familiar foi a presença de mais de 1 caso de precocidade sexual na prole ou no heredograma. O valor da taxa de penetrância (K) do *GABRA1* em famílias com mais de um membro afetado por PPDG foi estimado utilizando um programa compilado de rotinas matemáticas, denominado “Mathematica”, desenvolvido no Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo ⁵⁷. Neste cálculo foi assumido que a PPDG tem mecanismo autossômico dominante com penetrância incompleta como previamente demonstrado por De Vries et al¹⁶.

3.3 - Extração do DNA genômico

Amostras de DNA foram extraídas de leucócitos periféricos pela técnica de proteinase-K-extração com sal (*salting out*)⁵⁸. As amostras pertencem ao banco de DNA do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM/42) da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

Quinze mililitros de sangue venoso foram colhidos em tubos com 25 mM de ácido etileno diaminotetracético (EDTA). O botão leucocitário foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos, utilizando-se para isso 2

volumes de solução de lise (NH_4Cl 114 mM, NH_4HCO_3 1 mM) e incubando-se a 4° C por 30 minutos. O material foi centrifugado a 4° C durante 15 minutos a 3000 rpm (Sorvall, RT7, Germany), desprezando-se o sobrenadante. O procedimento da lise de glóbulos vermelhos foi repetido por mais uma vez. O botão de células brancas foi suspenso em 9 mL de solução de lise de glóbulos brancos (NaCl 150 mM, Tris - HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) com 180 μL de dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 150 μL de proteinase K (10 mg/mL) (Invitrogen, Life Technology, Gaithersburg, MD, USA), sendo o material incubado a 37° C por 18 horas.

Após esse período, 3,6 mL de solução saturada de cloreto de sódio (6M) foi adicionada agitando-se o conjunto vigorosamente durante 15 segundos. O material foi centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm (Sorvall, RT7, Germany). O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e o DNA foi precipitado acrescentando-se 2 volumes de etanol absoluto gelado, homogeneizando-se com cuidado por inversão. O DNA precipitado foi retirado do tubo, em seguida lavado em etanol 70%, repetindo-se a operação por mais três vezes. Por último, o DNA foi lavado em etanol absoluto, sendo secado em centrífuga a vácuo (Eppendorf, Concentrator 5301, Germany). Após tal procedimento, o DNA foi ressuscitado em tampão TE (10:0,1) (Tris-HCL 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0)

A concentração do DNA extraído foi obtida através de leitura em espectrofotômetro (Amersham, Pharmacia, Upsala, Suécia) no comprimento de onda de 260 nm (1,0 unidade DO 260= 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Foi estabelecido que a

relação de 1,8 entre as leituras de 260 e 280 nm seria ideal para a caracterização da pureza do material. As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em TAE (Tris 0,004 M; ácido acético glacial; EDTA 0,001 M, pH 8,0) para verificar a sua integridade.

3.4 - Reação de polimerização em cadeia (PCR)

O DNA genômico foi utilizado como substrato para amplificação da região codificadora do *GABRA1* constituída de 1055 nucleotídeos utilizando oligonucleotídeos específicos intrônicos que flanqueiam cada éxons (Tabela 1). Os oligonucleotídeos iniciadores intrônicos foram selecionados pelo programa Prime3OutPut⁵⁹. Em um volume final de 50 µL foram utilizados 100 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5 U de enzima *Taq DNA polimerase* (Amersham, Pharmacia, Upsala, Suécia) e tampão da reação fornecido pelo fabricante. A amplificação foi realizada em um termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O programa de amplificação consistiu de: 98°C 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 98°C 30 segundos, 55°C 30 segundos a 1 minuto de acordo com o tamanho do fragmento, 72°C 3 minutos e extensão final de 72°C 15 minutos. A temperatura de hibridação variou de acordo com os oligonucleotídeos utilizados (Tabela 1). Os produtos resultantes da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL), visualizados em luz ultravioleta e fotografados

para confirmar a amplificação do fragmento de interesse. O tamanho de cada fragmento amplificado está demonstrado na Tabela 1.

3.5 - Seqüenciamento Automático

A concentração de DNA dos produtos gerados pela PCR foi determinada através da comparação da intensidade de sinal emitido pelos produtos amplificados com os fragmentos de um marcador de peso molecular, de concentração conhecida após eletroforese em gel de agarose 2%. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à pré-purificação enzimática. A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando o kit ABI Prism™ BigDye Terminator (Applied Biosystem, Foster City, CA) e concentrações variáveis de DNA foram utilizadas de acordo com o tamanho do fragmento. Os produtos desta reação foram submetidos a eletroforese capilar em sequenciador automático ABI Prism Genetic Analyzer 3100 automatic DNA sequencer (Applied Biosystem, Foster City, CA).

3.6 - Predição de mudança de sítio de *splice*

Para investigar se os polimorfismos exônicos e intrônicos do *GABRA1* ocasionam alteração no uso do sítio de *splice* original, utilizamos um programa computacional de predição de alteração do uso do sítio de *splice* (www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)⁶⁰.

3.7 - Determinação do número de repetições GT do polimorfismo

IVS2 -712(GT)_n

Um polimorfismo previamente descrito no *GABRA1*, localizado no íntron 2, IVS2-712(GT)_n, com um número variável de repetições GT, foi estudado pela amplificação do fragmento correspondente a uma região específica no íntron 2, utilizando um par de oligonucleotídeos iniciadores⁵³: oligo sense marcado com um corante fluorescente na extremidade 5' **I2F** 5' FAM TCCAGCTTCCATCTGTTTGA e o oligo antisense **I2R** 5' CCGGAGTCGTGCTTTTATTC. Em um volume final de 50 µL foram utilizados 100 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5 U de enzima *Taq DNA polimerase* (Amersham, Pharmacia, Upsala, Suécia), tampão da reação fornecido pelo fabricante. A amplificação foi realizada em um termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O programa de amplificação consistiu de: 98°C 5 minutos, seguidos por 40 ciclos de 98°C 30 segundos, 55°C 1 minuto, 72°C 1 minuto e extensão final de 72°C 30 minutos. O produto resultante da reação foi submetido a eletroforese capilar em seqüenciador automático ABI Prism Genetic Analyzer 310 automatic DNA sequencer (Applied Biosystem, Foster City, CA).

Analisamos o tamanho dos fragmentos amplificados do íntron 2 para estudo do polimorfismo IVS-712(GT)_n pelo programa GeneScan (Applied

Biosystems, Foster City, CA, USA). O sequenciamento automático foi utilizado posteriormente para estabelecer a seqüência nucleotídea dos fragmentos amplificados. Com o objetivo de correlacionar o tamanho do fragmento com o número de repetições GT, uma amostra de DNA de um indivíduo homozigoto, identificado pela presença de um único sinal na representação gráfica fornecida pelo GeneScan, teve a região das repetições GT analisadas por sequenciamento automático. Adicionalmente, uma amostra controle, de tamanho previamente conhecido, foi incluída em todas as eletroforeses, a fim de se corrigir possíveis variações na análise do tamanho dos fragmentos.

3.8 - Digestão enzimática

Um polimorfismo no *GABRA1*, 1323G>A, localizado no éxon 11, foi estudado no grupo controle pela técnica de digestão enzimática. A presença da base nucleotídea G do polimorfismo 1323G>A cria um sítio de restrição da enzima *Tal* (MBI, Fermentas, Hanover, MD, USA). Portanto, na presença da base nucleotídea A, o fragmento inicial de 660 pb não sofre digestão, enquanto na presença da base nucleotídea G, dois fragmentos (456 e 204 pb) são originados. Indivíduos heterozigotos para este polimorfismo apresentam 3 fragmentos de DNA (660, 456 e 204 pb). Esta metodologia mais fácil e rápida, foi utilizada para rastreamento deste polimorfismo no grupo controle.

A reação de digestão foi realizada utilizando 3 μ L do produto de PCR do éxon 11, 1 U da enzima *TaqI* e o tampão da reação fornecido pelo fabricante por 2 horas a 65°C. O produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e fotografado sob luz ultravioleta.

3.9 – Estudo eletroencefalográfico

O EEG foi realizado no Serviço de Eletroencefalografia da Disciplina de Neurologia do HCFMUSP em aparelho analógico (Neurofax, Nihon Kohden) ou digital (Neuromap, Neurotec). Foram utilizadas derivações mono e bipolares, com eletrodos dispostos segundo o sistema internacional de colocação de eletrodos (sistema 10-20)⁶¹.

3.10 - Análise estatística

Os dados clínicos e hormonais foram apresentados em média \pm DP e intervalo.

Para comparar as frequências genotípica e alélica dos polimorfismos no *GABRA1* entre pacientes com PPDG e controles, foram considerados apenas indivíduos não relacionados, incluindo somente o propósito de cada família com PPDG, totalizando 28 meninas com a forma idiopática de PPDG.

Para a análise dos dados, foi utilizado o programa GraphPad InStat3 (GraphPad *software*, Inc., San Diego, CA). A distribuição genotípica e a frequência alélica entre pacientes com PPDG e o grupo controle foram avaliadas em tabelas de contingência, pelo teste exato de Fisher ou teste qui-quadrado (χ^2). Foram considerados significantes valores de $p < 0,05$.

Para comparar a distribuição genotípica e a frequência alélica dos polimorfismos do *GABRA1* entre os grupos de pacientes com PPDG sem e com anormalidades eletroencefalográficas, foi utilizado o teste exato de Fisher seguido pela correção de Bonferroni, que consiste em corrigir o valor crítico de significância (α), dividindo 0,05 pelo número de testes realizados (0,05/10), sendo considerados significantes nesta comparação, valores individuais de $p < 0,005$.

4 . RESULTADOS

4.1 - Forma familiar da puberdade precoce: frequência e modo de herança.

Trinta e uma pacientes do sexo feminino com diagnóstico clínico e laboratorial da forma idiopática de PPDG foram estudadas. Vinte e cinco das 31 pacientes (80,6%) apresentavam a forma esporádica de PPDG e 6 (19,4%) a forma familiar pertencentes a 3 famílias não relacionadas. O heredograma das meninas com a forma idiopática de PPDG forma familiar é apresentado na Figura 4. A análise de segregação da família 3 sugeriu uma forma de herança autossômica dominante. A taxa de penetrância calculada para as três genealogias foi de 70% (K=0,7).

4.2 - Dados clínicos e hormonais

A idade cronológica (IC) média do início do aparecimento dos caracteres sexuais secundários foi de $4,7 \pm 2,1$ anos (0,33 – 7 anos), e a IC média da primeira consulta foi 7 ± 2 anos (1,66 – 10,25 anos).

Na primeira consulta, ao exame físico, as pacientes apresentavam estadio puberal de acordo com os critérios de Tanner e Marshall^{23,24} para mamas (M), variando de M2 a M4 e para pêlos pubianos (PP) variando de PP1 a PP4. A idade óssea (IO) média foi $9,8 \pm 2,2$ anos (2 – 12 anos). Os dados clínicos das pacientes estão sumarizados na Tabela 2.

Duas pacientes (casos 14 e 23) apresentavam diagnóstico prévio de epilepsia generalizada idiopática, e já estavam em seguimento neurológico e em tratamento com anticonvulsivantes.

Trinta pacientes tinham dosagens de gonadotrofinas dosadas pelo método IFME e uma (caso 24) pelo método RIE. De acordo com os critérios hormonais previamente descritos para o método IFME, 22 das 30 pacientes (73,3%) apresentavam LH basal em nível puberal ($LH > 0,6$ U/L). Vinte e três pacientes das 30 (76,7%), realizaram teste de estímulo com GnRH, sendo que 21 (91,3%) apresentaram pico de $LH > 6,9$ U/L, indicando ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Onze das 30 pacientes (36,7%) tinham $LH > 10$ U/L dosado 2 horas após a primeira dose de acetato de leuprolide 3,75 mg. Uma paciente (caso 24) que teve as dosagens de gonadotrofinas realizadas pelo método RIE, apresentou valores de pico de LH de 28,8 U/L, preenchendo os critérios de ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. As concentrações de estradiol foram dosadas por RIE em 6 pacientes, sendo que 3 (50%) apresentaram níveis puberais (>10 pg/mL), e por FIE em 25 pacientes, sendo que 17 (68%) apresentaram níveis puberais (>13 pg/mL). As duas pacientes (casos 16 e 25) que não apresentaram critérios laboratoriais que satisfaziam os critérios estabelecidos no teste clássico de estímulo com GnRH apresentaram níveis de $LH \geq 10$ U/L, 2 hs após a primeira dose de acetato de leuprolide 3,75 mg, além de apresentarem quadro clínico fortemente sugestivo de puberdade precoce. Possíveis causas periféricas de precocidade sexual foram afastadas nestas duas

pacientes. O tratamento com análogo de GnRH foi instituído, e a evolução clínico-laboratorial confirmou o diagnóstico de PPDG. Os dados laboratoriais das pacientes são mostrados na Tabela 3.

4.3 – Estudo molecular

Todos os fragmentos exônicos do *GABRA1* que codificam a subunidade $\alpha 1$ do receptor tipo A do GABA e um fragmento do íntron 2, foram amplificados com sucesso. Identificamos 7 polimorfismos distintos: 2 silenciosos exônicos (156T>C e 1323G>A) e cinco variantes alélicas intrônicas (IVS2-712(GT)_n, no íntron 2; IVS3+12A>T, no íntron 3; IVS8+45T>G, no íntron 8; IVS9+76A>G, no íntron 9 e IVS10+15G>A, no íntron 10). A representação esquemática do *GABRA1* com a localização dos polimorfismos identificados é apresentada na Figura 5. O genótipo das 31 pacientes estudadas com os 7 polimorfismos identificados está apresentado na Tabela 4. Nenhuma mutação funcional foi identificada na região codificadora do *GABRA1*.

O polimorfismo exônico 156T>C, localizado no éxon 4, já descrito num banco de dados (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP), foi caracterizado pela substituição da terceira base do códon 52 (Gly). Um novo polimorfismo 1323G>A, localizado no éxon 11, foi caracterizado pela substituição da terceira base do códon 441 (Thr) (Figuras 6 e 7).

O polimorfismo 1323G>A foi identificado em heterozigose em 4% no grupo com PPDG e em 8% no grupo controle. A representação da

digestão enzimática com a enzima *TaqI* deste polimorfismo no grupo controle está demonstrada na Figura 8.

A distribuição genotípica e a frequência alélica dos 2 polimorfismos exônicos do *GABRA1*, 156T>C e 1323G>A, nas pacientes com a forma idiopática da PPDG e em 50 controles não relacionados estão apresentadas na Tabela 5. Não houve diferença estatisticamente significativa da distribuição genotípica e da frequência alélica dos dois polimorfismos exônicos entre os grupos ($p=0,92$ e $0,44$, para a distribuição genotípica e $p=0,85$ e $0,45$, para a frequência alélica, respectivamente).

A análise de uma amostra de DNA de um indivíduo homocigoto para o polimorfismo IVS2-712(GT) n indicou que o fragmento com tamanho de 247 pb fornecido pelo programa GeneScan corresponde a 12 repetições GT no sequenciamento automático (Figura 9). Identificamos 12 diferentes alelos para o polimorfismo IVS2-712(GT) n , que variaram de 10 a 24 repetições, (GT) $_{10}$ a (GT) $_{24}$. A frequência alélica do polimorfismo IVS2-712(GT) n está demonstrada na Tabela 6. A comparação da frequência alélica deste polimorfismo entre o grupo de meninas com PPDG e em 73 controles não evidenciou diferença estatisticamente significativa (Tabela 6). Não houve diferença estatisticamente significativa da distribuição genotípica do polimorfismo IVS2-712(GT) n entre o grupo de pacientes com PPDG e o grupo controle (Tabela 7). No entanto, observamos tanto nas pacientes com PPDG quanto nos controles, uma maior frequência dos alelos correspondentes a 12 e 17 repetições GT. Considerando a presença do alelo (GT) $_{12}$, 64% das pacientes e 77% dos controles apresentaram genótipo

formado pelo alelo (GT)₁₂ em homo ou heterozigose. No entanto, a comparação da frequência genotípica entre as pacientes com PPDG e os controles não foi estatisticamente significativa ($p=0,22$) (Tabela 8). Considerando a presença do alelo (GT)₁₇, 32% das pacientes e 38% dos controles apresentaram genótipo formado pelo alelo (GT)₁₇ em homo ou heterozigose. No entanto, a comparação da frequência genotípica entre as pacientes com forma idiopática da PPDG e os controles não foi estatisticamente significativa ($p=0,64$) (Tabela 9).

Os demais polimorfismos intrônicos IVS3+12A>T; IVS8+45T>G; IVS9+76A>G e IVS10+15G>A foram identificados nas posições adjacentes aos éxons 3, 8, 9 e 10, respectivamente. A distribuição genotípica e a frequência alélica dos polimorfismos IVS3+12A>T; IVS8+45T>G; IVS9+76A>G e IVS10+15G>A, no grupo das pacientes com PPDG estão apresentados na Tabela 10. Tratando-se de polimorfismos já descritos (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP), não estimamos as suas frequências no grupo controle. Nenhum destes polimorfismos apresentou alteração na predição do uso do sítio de *splice* original.

Um artefato metodológico de ocorrência randômica, caracterizado por uma deleção de uma base T em uma região rica em base T (11 repetições) foi identificado no íntron 9 (nucleotídeos posicionados de -9 a -19 em relação ao éxon 10). Este artefato foi encontrado em todas as pacientes com PPDG e no grupo controle. A representação deste achado está demonstrada na Figura 10.

4.4 - Estudo eletroencefalográfico

Vinte e três (74,2%) das 31 pacientes realizaram estudo eletroencefalográfico (EEG), incluindo as duas portadoras de epilepsia (casos 14 e 23). O traçado eletroencefalográfico foi normal em 17 pacientes (78,3%) e anormal em 6 (21,7%). Entre as 21 pacientes sem epilepsia, 4 evidenciaram anormalidades no EEG caracterizadas por paroxismos raros de espículas e de ondas agudas de projeção na região frontal direita (caso 13 - Figura 11); paroxismos de espículas e ondas agudas de projeção na região temporal média direita (caso 19 - Figura 12); ondas delta ritmadas, intermitentes nas regiões occipitais bilaterais (caso 29 – Figura 13) e paroxismos de espículas, ondas agudas e ondas lentas irregulares de projeção nas regiões temporo - parietais bilaterais, ora a esquerda, ora a direita, principalmente em períodos de sonolência e durante o sono (caso 30 – Figura 14). As duas pacientes portadoras de epilepsia apresentavam as seguintes alterações no EEG: paroxismos de ondas pontiagudas e de ondas lentas irregulares de projeção no hemisfério esquerdo com difusão para a região fronto central mediana (caso 14 – Figura 15) e paroxismos de complexos de espícula-onda ritmados a 3/seg de projeção generalizada com predomínio no hemisfério direito (caso 23 – Figura 16).

Duas pacientes com PPDG (casos 29 e 30) com anormalidades eletroencefalográficas são irmãs e pertencem à família 2 (Figura 4). A paciente 28, também pertencente à família 2 apresentou EEG normal. O

genótipo das meninas com PPDG, que foram submetidas ao EEG está demonstrado na Tabela 4.

A comparação das frequências genotípica e alélica dos polimorfismos identificados no *GABRA1* entre as meninas não relacionadas, com a forma idiopática de PPDG sem (n=15) e com (n=5) anormalidades eletroencefalográficas está demonstrada na Tabela 11. A distribuição genotípica e a frequência alélica de 6 polimorfismos identificados no *GABRA1* não diferiram significativamente entre os grupos de pacientes com PPDG sem e com anormalidades eletroencefalográficas, considerando o nível crítico de $p < 0,005$.

A comparação da distribuição genotípica e da frequência alélica do polimorfismo IVS2-712(GT)_n no *GABRA1*, entre as meninas com a forma idiopática de PPDG sem e com anormalidades eletroencefalográficas, não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Tabela 12 e 13).

5 – DISCUSSÃO

A identificação de genes que regulam o tempo de puberdade representa uma oportunidade de aumentarmos nossa compreensão dos fatores que modulam o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal na espécie humana¹⁴. Os fatores que regulam a idade de início da puberdade humana ainda não estão totalmente esclarecidos. As evidências sugerem que fatores ambientais, sócio-culturais e metabólicos são reguladores críticos do início da puberdade, mas tais fatores encontram-se sob uma regulação genética ainda pouco conhecida¹⁴. A busca por genes envolvidos no controle da transcrição gênica durante o processo puberal ainda está no seu início.

Do ponto de vista etiológico, a minoria dos casos de PPDG no sexo feminino tem uma causa definida (hamartomas hipotalâmicos, processos expansivos, infecções, malformações do SNC, etc)²². As lesões do SNC predis põem de forma equivalente tanto o sexo masculino quanto o feminino ao início precoce da puberdade. No entanto, quando nenhuma causa orgânica é detectada e o processo é considerado idiopático, um predomínio no sexo feminino é nitidamente observado (10 F:1 M) na maioria dos relatos^{14,22}. Na outra extremidade, tem-se que o predomínio do atraso constitucional do início da puberdade, sem etiologia definida, predomina no sexo masculino¹⁴.

Neste estudo, encontramos 19,4% (6/31) de casos de forma familiar de PPDG, sendo pertencentes a 3 famílias distintas (Figura 3). De Vries et al.¹⁶, recentemente demonstraram 27,5% de forma familiar de PPDG. A análise dos heredogramas das 3 famílias brasileiras envolvidas no

nosso estudo, sugere herança autossômica dominante na família 3. A partir das configurações das três genealogias estimamos o valor da taxa de penetrância gênica considerando a hipótese de mecanismo autossômico dominante com penetrância incompleta ($K=0,7$). Estes dados indicam a necessidade de uma história familiar detalhada e alertam para o risco de um novo caso de puberdade precoce na mesma família.

Neste estudo, nenhuma mutação funcional foi encontrada na região codificadora do *GABRA1*. Em contrapartida, tratando-se de um gene polimórfico, as variações nucleotídeas sinônimas encontradas na região codificadora (156T>C, códon 52 no éxon 4 e 1323G>A, códon 441 no éxon 11) e o já conhecido polimorfismo intrônico IVS2-712(GT)_n não diferiram significativamente em frequência na população com a forma idiopática da PPDG e no grupo controle.

O artefato encontrado na análise da sequência do íntron 9/éxon 10 remete ao fenômeno de mecanismo mutacional denominado *slippage*, no qual a probabilidade de inserções ou deleções aumenta diretamente com o aumento do número de repetições nucleotídeas⁶². No entanto, este achado que foi encontrado em todos os pacientes e no grupo controle, sugere não representar qualquer efeito biológico, tendo sido considerado apenas um evento *in vitro*.

Até o momento, mais de 145 polimorfismos no *GABRA1* foram depositados no banco de dados o NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNPs), sendo apenas 1 não sinônimo, W122R (rs1129648), a substituição de um triptofano por uma arginina, no aminoácido 122. Polimorfismos no *GABRA1*

têm sido relacionados com distúrbios psiquiátricos (transtorno bipolar, unipolar, ansiedade, alcoolismo)^{53,63}. Tal correlação tem sido baseada exclusivamente em estudos de freqüência e associação de polimorfismos (haplótipos) que diferem estatisticamente dos grupos controle.

Algumas interações entre polimorfismos em genes que codificam outras subunidades do receptor de GABA_A têm sido descritas⁶³. O polimorfismo IVS10+15G>A no *GABRA1* associado ao 1497C>T no *GABRA6*, gene que codifica a subunidade $\alpha 6$ do receptor GABA_A mostra significativa associação com distúrbios do humor em pacientes do sexo feminino⁶³. Hourich et al.⁵³ demonstraram a associação dos polimorfismos IVS2-712(GT)_n, localizado no íntron 2 e do polimorfismo 156T>C, no éxon 4, com distúrbios bipolares, motivando-nos a investigá-los nas meninas com a forma idiopática da PPDG. Os autores demonstraram que um haplótipo específico composto pelo alelo (GT)₁₇ associado ao alelo C teria possível efeito protetor na ocorrência dos distúrbios bipolares. Nenhum estudo funcional foi realizado nesta investigação⁵³. No nosso estudo, nenhuma associação foi encontrada entre estes polimorfismos e a puberdade precoce.

A única mutação descrita no *GABRA1* com alteração funcional, Ala 322Arg (OMIM ID 137160), a substituição de um aminoácido alanina por uma arginina na posição 322, foi identificada em uma família franco-canadense com epilepsia mioclônica juvenil familiar⁶⁴. Esta condição é uma forma de epilepsia caracterizada por convulsões afebris, de início na puberdade e acompanhada de ataques mioclônicos. No entanto, anormalidades no desenvolvimento puberal nesta família não são

descritas⁶⁴. O estudo funcional desta mutação evidenciou *in vitro* uma menor amplitude de corrente elétrica ativada pelo GABA, sugerindo que as convulsões poderiam resultar da perda da função inibitória exercida pelo GABA no seu receptor⁶⁴.

O fato de não termos encontrado mutações ou variantes alélicas que correlacionem o *GABRA1* com puberdade precoce, não exclui a possibilidade de que defeitos em outras subunidades, principalmente $\beta 2$ e $\gamma 2$, que juntamente com a subunidade $\alpha 1$ representam a composição heteropentamérica mais abundante no sistema nervoso central, ou em outros passos na complexa cascata de síntese, ação e degradação deste neurotransmissor possam ocorrer. O comprometimento das outras subunidades do receptor de GABA e conseqüentemente das suas interações com a subunidade $\alpha 1$, ainda são pouco conhecidas. Finalmente, tratando-se de um evento multifatorial, a compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação do início da puberdade continua desafiador.

Nós identificamos 6 de 23 meninas (26%) com a forma idiopática de PPDG com anormalidades eletroencefalográficas, sendo que 2 eram portadoras de epilepsia e 4 não tinham histórico de crises convulsivas. Dentre as anormalidades encontradas EEG, cinco (casos 13, 14, 19, 23 e 30) foram caracterizadas como epileptiformes (espículas, ondas agudas e complexos de espículas-onda, ondas pontiagudas, e uma (caso 29) apresentou uma anormalidade eletroencefalográfica de etiologia e papel fisiopatológico indefinidos, caracterizada por atividade de ondas delta intermitentes na região occipital⁶⁵. Interessantemente, 2 pacientes (casos 29 e 30) com

anormalidades eletroencefalográficas pertencem à mesma família, sugerindo que o fenótipo composto por anormalidade eletroencefalográfica e PPDG podem ser modulados por fatores genéticos. Não houve diferença estatisticamente significativa da distribuição genotípica e da frequência alélica dos polimorfismos do *GABRA1* entre os grupos de pacientes sem e com anormalidades eletroencefalográficas. Apenas a comparação da frequência alélica do polimorfismo 156T>C entre as meninas com PPDG sem e com anormalidades eletroencefalográficas foi inicialmente estatisticamente significativa ($p=0,04$). No entanto, quando utilizamos a correção do valor crítico de p ($<0,005$), esta diferença não mais representa uma significância estatística. Uma ampliação do estudo, incluindo um grupo controle com avaliação do EEG, é necessária para estabelecer uma possível associação dos polimorfismos do *GABRA1* com anormalidades eletroencefalográficas. Não obtivemos correlação entre os demais polimorfismos no *GABRA1* e as anormalidades no EEG nas pacientes com PPDG. Outras subunidades do receptor necessitam ser investigadas para excluir definitivamente esta associação, uma vez que tais anormalidades são presumivelmente causadas por hiperexcitabilidade cortical idade-dependente, na qual o GABA tem um papel importante⁴⁴⁻⁴⁷.

A correlação entre anormalidades eletroencefalográficas e alterações GABAérgicas tem sido demonstrada em algumas situações neuropsiquiátricas, como em algumas formas na epilepsia, no alcoolismo e nos estudos que objetivam estudar os efeitos de substâncias neuroativas atuando nos diferentes receptores de GABA⁴⁶⁻⁴⁸. Por exemplo,

anormalidades nas subunidades do receptor GABA_A já foram associadas a alterações eletroencefalográficas específicas. O GABA está envolvido na gênese de diferentes atividades rítmicas cerebrais que podem ser moduladas por algumas drogas que exercem seus efeitos por ligarem-se aos receptores de GABA, através do seus efeitos nas subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 5$, como por exemplo os benzodiazepínicos^{46,47}. Alterações na subunidade $\alpha 2$ do receptor GABA_A estão implicadas com o alcoolismo, que é uma doença complexa com fatores de risco tanto genéticos quanto ambientais, na qual são detectadas alterações eletroencefalográficas típicas (frequência beta)⁴⁸.

Dois trabalhos que realizaram estudo EEG em pacientes com puberdade precoce descreveram notavelmente uma alta prevalência de anormalidades^{44,45}. No entanto, nestes 2 estudos, os pacientes apresentavam tanto a forma idiopática de PPDG quanto a forma orgânica. Liu et al.⁴⁴, na década de 70, descreveram que 34 de 42 (81%) pacientes com puberdade precoce idiopática avaliados tinham anormalidades no EEG, sendo que 4 destes tinham crises convulsivas. No grupo de pacientes com puberdade precoce de causa orgânica (n=16), 96% dos traçados eram anormais. A maioria das anormalidades eletroencefalográficas se caracterizava pela presença de ondas lentas e paroxismos, bem como de complexos espícula-onda de natureza difusa⁴⁴. Posteriormente, Theodore et al⁴⁵, descreveram 19 pacientes, sendo 8 com a forma idiopática de PPDG, 3 com lesões intracerebrais (glioma ótico e hamartoma hipotalâmico), em 5 a etiologia era indefinida e 3 tinham pubarca precoce, e encontraram

anormalidades no EEG em 5 dos 16 pacientes com PPDG e em 2 dos 3 com pubarca precoce. Nenhum paciente tinha história de crises convulsivas. Em ambos os trabalhos, os autores concluíram que o EEG anormal nestas pacientes poderia refletir uma doença diencefálica oculta com uma disfunção neurofisiológica difusa. Após estes dois estudos, nossa análise eletroencefalográfica representa o primeiro estudo em crianças com a forma idiopática de PPDG que foram submetidas ao exame de ressonância magnética do SNC. Do ponto de vistas clínico, não está definida a importância das anormalidades eletroencefalográficas em pacientes sem crises convulsivas. Uma avaliação neuropsiquiátrica refinada, focalizando distúrbios comportamentais ou de cognição, serão úteis no esclarecimento do papel fisiopatológico destas anormalidades eletroencefalográfica, como por exemplo, uma alteração neurológica subclínica. É de interesse notar que anormalidades eletroencefalográficas na população normal variam de 6 a 16% de acordo com as maiores séries da literatura^{44,45,65}. Nossos resultados sugerem que a análise do EEG deve ser incluída na investigação da PPDG, e havendo anormalidades no traçado, um seguimento clínico-neurológico é recomendado.

6 – CONCLUSÕES

1. Identificamos PPDG idiopática de origem familiar em 19,4% das pacientes, com modo de herança autossômico dominante em uma família, com penetrância incompleta, indicando a origem genética nesta condição.
2. O *GABRA1* é um gene altamente polimórfico, tendo sido identificados 2 polimorfismos exônicos e 5 intrônicos em nossa casuística.
3. Nenhuma mutação funcional foi identificada no *GABRA1* nas meninas com a forma idiopática da PPDG.
4. A distribuição genotípica e a frequência alélica dos polimorfismos no *GABRA1* não diferiram significativamente entre as pacientes com a forma idiopática da PPDG e o grupo controle.
5. Anormalidades eletroencefalográficas foram detectadas em 26% das pacientes com a forma idiopática de PPDG, indicando a importância da realização do EEG na investigação da puberdade precoce idiopática.
6. Não houve associação entre a distribuição genotípica e a frequência alélica dos polimorfismos do *GABRA1* com as anormalidades eletroencefalográficas nas pacientes com PPDG.

7. Alterações genóticas do *GABRA1* não foram associadas ao fenótipo da forma idiopática de PPDG.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores e condições de amplificação por PCR da região codificadora do *GABRA1*

Exon	Temperatura de hibridação	Tamanho do Fragmento (pb)	Oligo	Seqüência Nucleotídea
3	55°	297	F	5' CAGTCAGCCCTGGTGGTTAT 3'
			R	5' TAGCTGGAAATTATTGCAGTTAAG 3'
4	55°	498	F	5' TGGAAAGAGGTTTTAGTAGAAATGTAT 3'
			R	5' GCAGTCATTGTGCTGGAAGA 3'
5	51°	379	F	5' GACACTCACTCGCCCAATTT 3'
			R	5' GGGGTATTAACCAATTCAA 3'
6	55°	372	F	5' GCATTGCAAATAACAGCACA 3'
			R	5' CAAATATTCCACCATGGCTCA 3'
7	55°	290	F	5' CCCTGCAATTATGCCTTCTT 3'
			R	5' CCTTATCTACGCGTTTTTCTCAC 3'
8	53°	501	F	5' AATTGAAGTGGTAAAATATATGGATCA 3'
			R	5' GGGGAATAAGGATTTAACCCAG 3'
9	55°	231	F	5' CAAATTGCTCATCTTTCTTGTG 3'
			R	5' TGAGAGTGGCAATTCCTTGA 3'
10	55°	544	F	5' TGCCATTCCATGAATCACAG 3'
			R	5' TCATGGCACTTAATTGTTTACG 3'
11	55°	660	F	5' TTCTTGATGGCAAAGGCTA 3'
			R	5' CAGGGGTCTCTTGTCTTAAATGA 3'

F – oligo *sense* R- oligo *antisense*

Tabela 2 – Dados clínicos das meninas com PPDG idiopática.

Caso	IC de início da puberdade (anos)	IC da primeira consulta	IO na primeira consulta	Altura (cm)	DPalt/IC	Idade Estatural (anos)	Peso (kg)	DPpeso/alt	Estadio Puberal (Tanner)	Menarca materna (anos)
1	6,0	7,33	9,0	129,5	1,31	8,75	38,2	2,17	M3PP3	11,5
2	4,0	5,25	6,83	115,7	1,8	6,33	19,6	-0,5	M3PP1	14
3	6,0	8,66	12,0	141,5	2,33	10,75	33,2	-0,16	M4PP4	11,5
5	6,5	8,08	12,0	136,8	2,05	10,75	33,6	0,37	M3PP3	13
4	6,25	6,66	10,0	124,0	1,43	8,0	25,7	0,25	M2PP1	12
6	1,25	2,66	6,83	100,5	2,8	4,0	18,3	1,04	M4PP4	12
7	0,66	1,66	2,0	83	0	1,75	12,4	0,53	M4PP3	11,5
8	3,17	3,42	6,83	106	2,22	5,0	19,1	0,53	M4PP1	12
9	6,42	7,83	11,0	141,5	3,05	10,5	32,8	-0,21	M3PP4	12
10	2,33	7,25	11,0	136,4	3,13	10,0	37,7	1,0	M3PP2	11,5
11	6,0	6,42	8,83	123,1	0,73	7,66	26,6	0,62	M2PP2	12
12	2,33	4,75	8,83	118,8	2,27	6,83	24,7	0,76	M4PP1	13
13	3,17	5,17	12,0	129,4	3,5	8,83	30,0	0,53	M4PP3	12
14	7,0	7,83	11,0	136,5	2,17	10,0	38,9	1,17	M3PP1	12
15	5,83	9,66	12,0	134	0,08	9,66	38,8	1,46	M4PP3	13
16	3,17	6,5	8,83	136	3,69	10,0	30,4	-0,1	M4PP3	12

IC – idade cronológica IO – idade óssea DP – desvio-padrão M – mamas PP – pêlos pubianos

continua

Tabela 2 – Dados clínicos das meninas com PPDG idiopática (continuação).

Caso	IC (anos) de início da puberdade	IC da primeira consulta	IO na primeira consulta	Altura (cm)	DPalt/IC	Idade Estatural (anos)	Peso (kg)	DPpeso/alt	Estadio Puberal (Tanner)	Menarca materna (anos)
17	6,66	7,33	10,0	125,5	0,8	8,17	35,4	2,3	M3PP2	12
18	6,83	7,83	8,83	125,5	-0,15	8,17	27,9	0,56	M3PP3	12,5
19	4,0	6,83	9,5	133,5	3,22	9,5	31,3	0,34	M4PP3	13
20	2,33	7,42	11,0	140,0	2,67	10,66	34,4	0,1	M2PP4	15
21	0,33	8,58	11,0	131,5	0,63	9,17	26,7	-0,27	M4PP2	ND
22	7,0	8,75	11,5	135,4	0,95	9,83	32,6	0,33	M3PP3	12
23	6,0	8,0	11,0	128	0,4	8,66	32	0,9	M3PP3	12
24	2,0	4,83	8,0	115	2,4	6,33	23,3	0,64	M3PP1	11,5
25	6,0	8,25	12,0	128,6	0,30	8,66	30,7	0,80	M3PP2	12
26 ^{F1}	6,5	10,25	11,0	131,7	-0,1	9,0	37	1,78	M4PP5	12
27 ^{F1}	7,0	9,83	11,5	141,4	0,7	11,0	34,8	-0,04	M4PP4	12
28 ^{F2}	5,83	6,66	11,0	129,5	2,46	9,0	30	0,44	M4PP2	12
29 ^{F2}	5,0	8,0	11,0	136,3	1,96	10,0	36,2	0,76	M4PP1	12
30 ^{F2}	4,0	6,42	7,0	125,5	1,71	8,0	26,5	0,36	M3PP1	12
31 ^{F3}	5,5	8,08	11,0	132	1,21	9,0	28,2	0,09	M3PP4	9
Média± DP (Intervalo)	4,7 ± 2,1 (0,33 – 7,0)	7 ± 2 (1,66 – 10,25)	9,8 ± 2,2 (2 – 12)	127,5 ± 12,8 (83-141,5)	1,6±1,1 (-0,1 – 3,7)	8,5 ± 2 (1,75 – 11)	29,9 ± 6,5 (12,4 – 38,9)	0,6±0,6 (-1,5 – 2,3)		12 ± 1 (9-12)

IC – idade cronológica IO – idade óssea DP – desvio-padrão ND-não disponível M – mamas PP – pêlos pubianos

F1, F2 e F3: casos familiares pretencentes às famílias 1, 2 e 3, respectivamente

Tabela 3 - Dados hormonais das meninas com a forma idiopática de PPDG

Caso	LH(U/L)			FSH (U/L)		Estradiol (pg/mL)
	Basal	Pico*	2 hs após leuprolide depot	Basal	Pico*	
1	<0,6	8,1	-	1,3	6,7	<13
2	<0,6	16,9	-	2,1	20,4	<13
3	1,2	-	-	3,7	-	19,8
4	0,7	7,5	31	3,0	5,2	45
5	1,5	6,9	-	2,8	9,9	21,1
6	2,6	30	28	4,5	16	<10**
7	1,1	-	13,1	4,3	-	60,4
8	5,0	-	-	9,8	-	<13
9	1,0	13	20	2,8	18	30**
10	0,9	-	-	1,8	-	<13
11	<0,6	9,5	-	4,7	24	<10**
12	0,8	18,8	-	3,3	9,9	19,1
13	4,9	23,7	25,6	5,9	12,9	14**
14	2,8	15	-	7,1	10,3	59,8
15	0,7	-	13,2	1,5	13,5	<13
16	<0,6	4,2	10	3,7	10,5	<13
17	1,4	20	23	1,8	7,5	<13
18	2,8	41	28	4,5	16	<10**
19	6,1	-	10,2	4,7	-	62
20	2,2	9,8	-	6,0	11	21
21	<0,6	8,5	-	1,5	16,9	22
22	1,2	19	-	1,8	5,4	13,1
23	1,0	8,8	-	1,9	9,5	17,4
24	3,8**	28,8**	-	16,3**	41,4**	23**
25	<0,6	5,3	12	2,7	25,8	13,4
26 ^{F1}	4,2	-	-	2,6	-	98,8
27 ^{F1}	1,7	34,1	-	3,9	11,3	20,2
28 ^{F3}	1,5	31,5	-	6,2	12,8	53,3
29 ^{F2}	1,2	19	-	1,8	5,4	13,1
30 ^{F2}	<0,6	11,4	-	1,5	12,7	<13
31 ^{F2}	<0,6	8,5	-	2,6	13,0	22
Média ± DP (Intervalo)	1,7 ± 1,5 (<0,6-6,1)	16,1 ± 10 (4,2 - 41)	19,5 ± 8 (10 - 31)	3,5 ± 2 (1,3 - 9,8)	12,7 ± 5,5 (5,2 - 25,8)	27,4 ± 22,4# (<13-98,8)

* após 100 mcg de gonadorelina i.v. ** RIE # IFME. A paciente 24 não foi incluída para cálculo da média ± DP.

Tabela 4 – Genótipo do *GABRA1* nas meninas com a forma idiopática de PPDG.

Caso	IVS2-712 (GT)n	IVS3+12A>T	156T>C	IVS8+45T>G	IVS9+76 A>G	IVS10+15G>A	1323G>A
1 [#]	(12)/(12)	AA	TT	TT	AA	AA	GG
2	(12)/(12)	AA	TT	TT	AA	AA	GG
3	(18)/(24)	AA	TC	TG	AG	GG	GG
4	(12)/(12)	AA	TT	TT	AA	AA	GG
5	(12)/(19)	AA	TC	TT	AA	AA	GA
6 [#]	(12)/(24)	AA	TC	TG	AA	AA	GG
7 [#]	(12)/(24)	AA	TC	TG	AA	GA	GG
8 [#]	(12)/(16)	AT	TT	TT	AA	AA	GG
9	(12)/(17)	AA	TC	TG	AA	GA	GG
10 [#]	(14)/(15)	AT	TC	TG	AA	GA	GG
11 [#]	(14)/(19)	AA	TC	TT	AA	AA	GG
12 [#]	(12)/(17)	AA	TT	TT	AG	GA	GG
13 [#]	(13)/(16)	AA	TT	TT	AA	AA	GG
14 [#]	(12)/(15)	AA	TT	TT	AA	AA	GG
15 [#]	(12)/(17)	AA	TT	TT	AG	GA	GG
16 [#]	(12)/(12)	AA	TT	TT	AA	GA	GG
17	(12)/(14)	AT	TC	TT	AA	AA	GG
18 [#]	(17)/(17)	AA	TC	TG	AG	GG	GG
19 [#]	(12)/(17)	AA	TT	TT	AG	GA	GG
20 [#]	(15)/(23)	AA	TC	TG	AG	GG	GG
21	(12)/(14)	AT	TC	TT	AA	AA	GG
22 [#]	(14)/(17)	AT	TT	TT	AG	GA	GG
23 [#]	(12)/(12)	AA	TT	TT	AA	AA	GG
24 [#]	(17)/(23)	AA	TC	TG	AG	GG	GG
25 [#]	(17)/(24)	AA	CC	TT	AA	GG	GG
26 ^{F1 #}	(12)/(24)	AA	TC	TG	AA	GA	GG
27 ^{F1 #}	(12)/(23)	AA	TC	TG	AA	GA	GG
28 ^{F2 #}	(17)/(17)	AA	TC	TG	AA	GA	GG
29 ^{F2 #}	(15)/(17)	AA	TT	TT	AA	GG	GG
30 ^{F2 #}	(15)/(17)	AA	TT	TG	AG	GA	GG
31 ^{F3}	(12)/(18)	AA	TC	TT	AA	AA	GG

F1-F2-F3: casos familiares pretencentes às famílias 1, 2 e 3 respectivamente
[#] pacientes que foram submetidas ao estudo eletroencefalográfico

Tabela 5 - Distribuição genotípica e freqüência alélica dos polimorfismos exônicos do *GABRA1* em meninas com a forma idiopática de PPDG e nos controles.

Polimorfismo	n	Genótipo						p	n	Freqüência alélica				p
		TT	(%)	TC	(%)	CC	(%)			T	(%)	C	(%)	
156T>C														
PPDG idiopática	28	13	(46)	14	(50)	1	(4)		56	40	(71)	16	(29)	
Controles	50	23	(46)	24	(48)	3	(6)	0,92	100	70	(70)	30	(30)	0,85
1323G>A														
PPDG idiopática	28	27	(96)	1	(4)	0	(0)		56	55	(98)	1	(2)	
Controles	50	46	(92)	4	(8)	0	(0)	0,44	100	96	(96)	4	(4)	0,45

Tabela -6 - Freqüência alélica do polimorfismo IVS2-712(GT)n nas meninas com a forma idiopática de PPDG e nos controles.

	PPDG	Freqüência (%)	Controles	Freqüência (%)	<i>p</i>
(GT)10	0	(0)	1	(0,7)	1,00
(GT) 12	22	(39,3)	76	(52)	0,10
(GT) 13	1	(1,8)	1	(0,7)	0,48
(GT) 14	5	(8,9)	5	(3,4)	0,14
(GT) 15	4	(7,1)	7	(4,8)	0,50
(GT) 16	2	(3,6)	4	(2,8)	0,67
(GT) 17	10	(17,8)	32	(21,9)	0,57
(GT) 18	2	(3,6)	4	(2,8)	0,67
(GT) 19	2	(3,6)	3	(2)	0,62
(GT) 22	1	(1,8)	1	(0,7)	0,48
(GT) 23	1	(1,8)	3	(2)	1,00
(GT) 24	6	(10,7)	9	(6,2)	0,36
Total	56	100	146	100	

Tabela -7- Distribuição genotípica do polimorfismo IVS2-712(GT)n nas meninas com a forma idiopática da PPDG e nos controles.

Genótipo	PPDG	Frequência (%)	Controles	Frequência (%)	p
(GT)10/ (GT)17	-	-	1	(1,4)	1,00
(GT)12/ (GT)12	5	(17,8)	20	(27,4)	0,44
(GT)12/ (GT)13	-	-	1	(1,4)	1,00
(GT)12/ (GT)14	1	(3,6)	3	(4,1)	1,00
(GT)12/ (GT)15	1	(3,6)	2	(2,7)	1,00
(GT)12/ (GT)16	1	(3,6)	2	(2,7)	1,00
(GT)12/ (GT)17	3	(10,7)	16	(21,9)	0,26
(GT)12/ (GT)18	1	(3,6)	3	(4,1)	1,00
(GT)12/ (GT)19	1	(3,6)	3	(4,1)	1,00
(GT)12/ (GT)24	4	(14,2)	4	(5,4)	0,21
(GT)12/ (GT)22	-	-	1	(1,4)	1,00
(GT)12/ (GT)23	1	(3,6)	1	(1,4)	0,48
(GT)13/ (GT)17	1	(3,6)	-	-	0,27
(GT)14/ (GT)15	1	(3,6)	-	-	0,27
(GT)14/ (GT)16	-	-	1	(1,4)	1,00
(GT)14/ (GT)17	1	(3,6)	1	(1,4)	0,48
(GT)14/ (GT)19	1	(3,6)	-	-	0,27
(GT)15/ (GT)15	-	-	1	(1,4)	1,00
(GT)15/ (GT)17	1	(3,6)	1	(1,4)	0,48
(GT)15/ (GT)23	1	(3,6)	-	-	0,27
(GT)15/ (GT)24	-	-	1	(1,4)	1,00
(GT)16/ (GT)17	-	-	1	(1,4)	1,00
(GT)17/ (GT)17	1	(3,6)	4	(5,5)	1,00
(GT)17/ (GT)18	-	-	2	(2,7)	1,00
(GT)17/ (GT)23	1	(3,6)	-	-	0,27
(GT)17/ (GT)24	1	(3,6)	2	(2,7)	1,00
(GT)18/ (GT)24	1	(3,6)	-	-	0,27
(GT)23/ (GT)24	-	-	2	(2,7)	1,00
Total	28	(100)	73	(100)	

Tabela 8 – Comparação entre os genótipos com e sem o alelo (GT)12 nas meninas com a forma idiopática de PPDG e nos controles

	PPDG idiopática		Controles	
	n	(%)	n	(%)
Presença do alelo (GT)12	18	(64)	56	(77)
Ausência do alelo (GT)12	10	(36)	17	(23)
Total	28	(100)	73	(100)

$p=0,22$

Tabela 9 – Comparação entre os genótipos com e sem o alelo (GT)17 nas meninas com a forma idiopática de PPDG e nos controles

	PPDG idiopática (%)		Controles (%)	
	n	(%)	n	(%)
Presença do alelo (GT)17	9	(32)	28	(38)
Ausência do alelo (GT)17	19	(68)	45	(62)
Total	28	(100)	73	(100)

$p=0,64$

Tabela -10- Distribuição genotípica e freqüência alélica dos polimorfismos intrônicos do *GABRA1* nas meninas com a forma idiopática da PPDG.

Polimorfismo	Genótipo							Freqüência alélica			
	n	AA (%)	AT (%)	TT (%)	n	A (%)	T (%)	G (%)			
IVS3+12A>T											
PPDG idiopática	28	23 (82)	5 (18)	0 (0)	56	51 (91)	5 (9)				
IVS8+45T>G											
PPDG idiopática	28	19 (68)	9 (32)	0 (0)	56	47 (84)	9 (16)				
IVS9+76A>G											
PPDG idiopática	28	20 (71)	8 (29)	0 (0)	56	48 (86)	8 (14)				
IVS10+15G>A											
PPDG idiopática	28	6 (21)	9 (32)	13 (47)	56	21 (37,5)	35 (62,5)				

Tabela 11 - Comparação da distribuição genotípica e da frequência alélica dos polimorfismos do *GABRA1* entre os pacientes com EEG normal e anormal.

Polimorfismo	n	Genótipo						p	n	Frequência alélica				p	
		AA (%)	AT (%)	TT (%)	TC (%)	CC (%)	TT (%)			A (%)	T (%)	C (%)	T (%)		G (%)
IVS3+12A>T															
EEG normal	15	12 (80)	3 (20)	0 (0)					30	27 (90)	3 (10)				
EEG anormal	5	5 (100)	0 (0)	0 (0)			0,54		10	10 (100)	0 (0)			0,56	
156T>C															
EEG normal	15	6 (40)	8 (53)	1 (7)					30	20 (67)	10 (33)				
EEG anormal	5	5 (100)	0 (0)	0 (0)			0,06		10	10 (100)	0 (0)			0,04	
IVS8+45T>G															
EEG normal	15	8 (53)	7 (47)	0 (0)					30	23 (76)	7 (24)				
EEG anormal	5	5 (100)	0 (0)	0 (0)			0,11		10	10 (100)	0 (0)			0,17	
IVS9+76A>G															
EEG normal	15	9 (60)	6 (40)	0 (0)					30	24 (80)	6 (20)				
EEG anormal	5	4 (80)	1 (20)	0 (0)			0,61		10	9 (90)	1 (10)			0,65	
IVS10+15G>A															
EEG normal	15	4 (26,5)	7 (47)	4 (26,5)					30	15 (50)	15 (50)				
EEG anormal	5	1 (20)	1 (20)	3 (60)			0,38		10	7 (70)	3 (30)			0,46	
1323G>A															
EEG normal	15	15 (100)	0 (0)	0 (0)					30	30 (100)	0 (0)				
EEG anormal	5	5 (100)	0 (0)	0 (0)			--		10	10 (100)	0 (0)			--	

* significância estatística $p < 0,005$ (correção de Bonferroni)

Tabela 12 – Distribuição genotípica do polimorfismo IVS2-712(GT)n nas pacientes com PPDG (não relacionadas) e com EEG normal e anormal

Genótipo	EEG normal		EEG anormal		<i>p</i>
	Freqüência	(%)	Freqüência	(%)	
GT(12)/GT(12)	2	(13,3)	1	(20)	1.00
GT(12)/GT(15)	0	-	1	(20)	0.25
GT(12)/GT(16)	1	(6,7)	0	-	1.00
GT(12)/GT(17)	2	(13,3)	1	(20)	1.00
GT(12)/GT(24)	3	(20)	0	-	0.54
GT(13)/GT(16)	0	-	1	(20)	0.25
GT(14)/GT(15)	1	(6,7)	0	-	1.00
GT(14)/GT(17)	1	(6,7)	0	-	1.00
GT(14)/GT(19)	1	(6,7)	0	-	1.00
GT(15)/GT(17)	0	-	1	(20)	0.25
GT(15)/GT(23)	1	(6,7)	0	-	1.00
GT(17)/GT(17)	1	(6,7)	0	-	1.00
GT(17)/GT(23)	1	(6,7)	0	-	1.00
GT(17)/GT(24)	1	(6,7)	0	-	1.00
Total	15	(100)	5	(100)	

Tabela 13 - Freqüência alélica do polimorfismo IVS2-712(GT)n nas pacientes com PPDG (não relacionadas) e com EEG normal e anormal

Alelo	Freqüência alélica (%)				<i>p</i>
	EEG normal		EEG anormal		
	n	%	n	%	
(GT)12	10	33	4	40	0,71
(GT)13	0	0	1	10	0,25
(GT)14	3	10	0	0	0,56
(GT)15	2	7	2	20	0,26
(GT)16	1	3	1	10	0,44
(GT)17	7	23	2	20	1,00
(GT)19	1	3	0	0	1,00
(GT)23	2	7	0	0	1,00
(GT)24	4	14	0	0	0,56
Total	30	100	10	100	

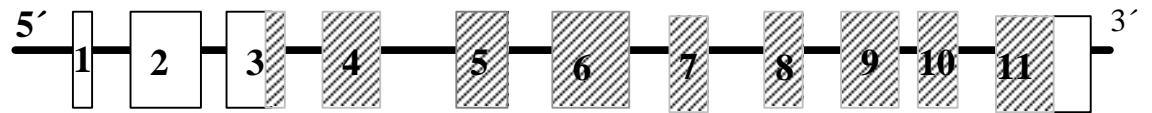


Figura 2 – Representação esquemática do *GABRA1*. A porção hachurada (éxons 3 a 11) corresponde à região codificadora do gene.

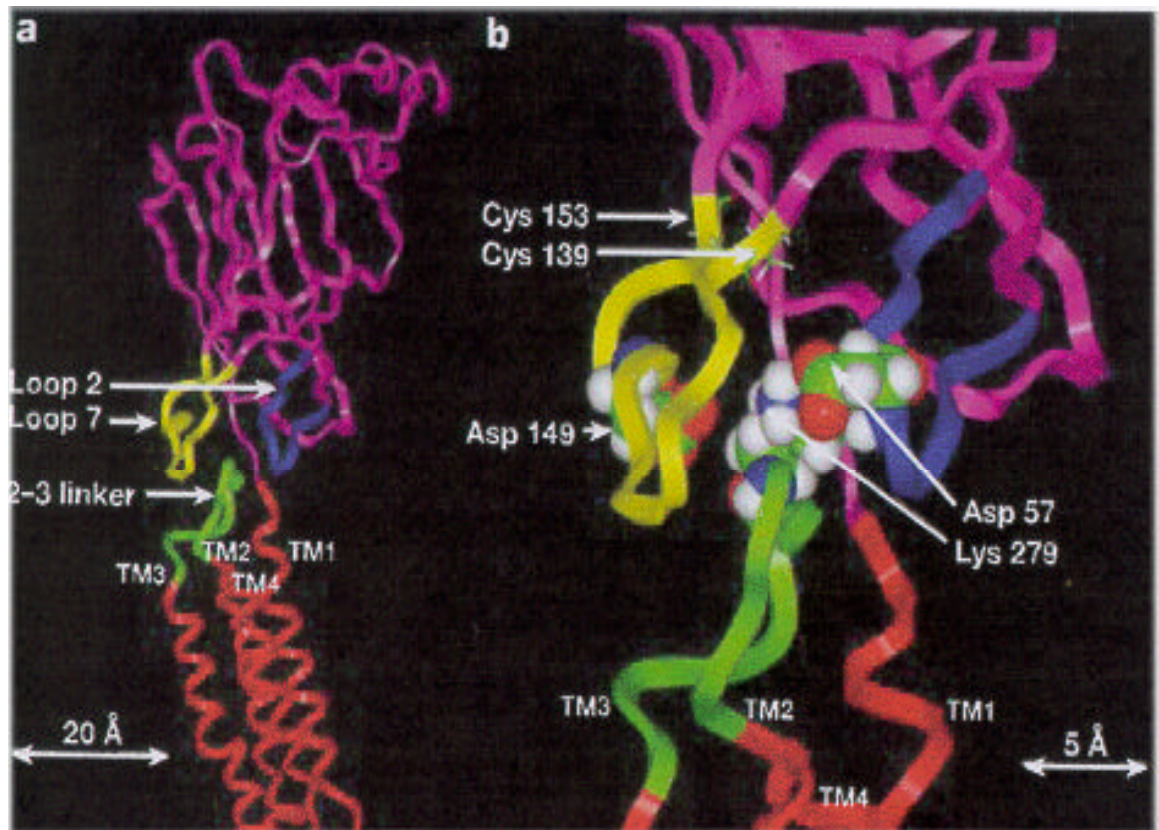


Figura 3 – Modelo molecular da subunidade $\alpha 1$ do receptor $GABA_A$. A - Visão a partir do centro do canal iônico. Em azul e amarelo estão representadas as alças 2 e 7 do domínio extracelular, respectivamente. Em verde, uma alça extracelular, chamada região *2-3Linker*, entre o segundo e o terceiro domínio transmembrana. Em vermelho, representados os domínios transmembrana. B – Visão detalhada das interações eletrostáticas entre os domínios transmembrana e extracelulares. O resíduo básico Lys279, na região *2-3Linker*, e os resíduos ácidos, Asp57 e Asp149, nas alças 2 e 7 têm papel chave no desencadeamento das alterações conformacionais que resultam na abertura do canal iônico⁴⁰.

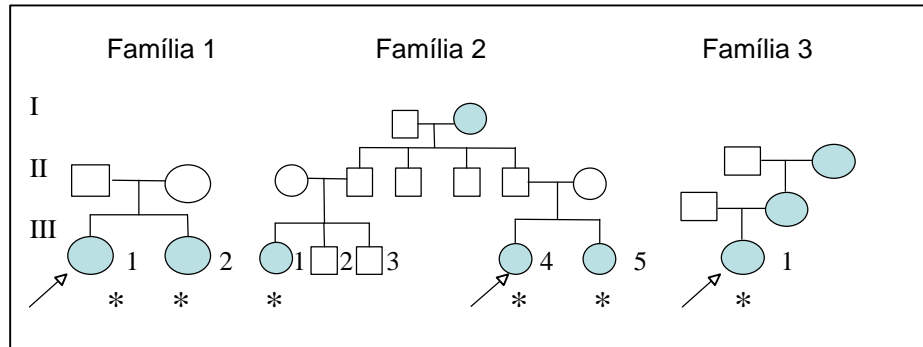


Figura 4 – Heredograma das 3 famílias com 9 casos de PPDG, sendo que 6, casos 26 a 31, representados com asterisco (*) foram estudados. As configurações genealógicas mostradas são compatíveis com a hipótese de herança autossômica dominante na família 3. (↗) - Propósito

Família 1 III:1 – caso 26
 Família 1 III:2 – caso 27

Família 2 III:1 – caso 28
 Família 2 III:4 – caso 29
 Família 2 III:5 – caso 30

Família 3 III:1 – caso 31

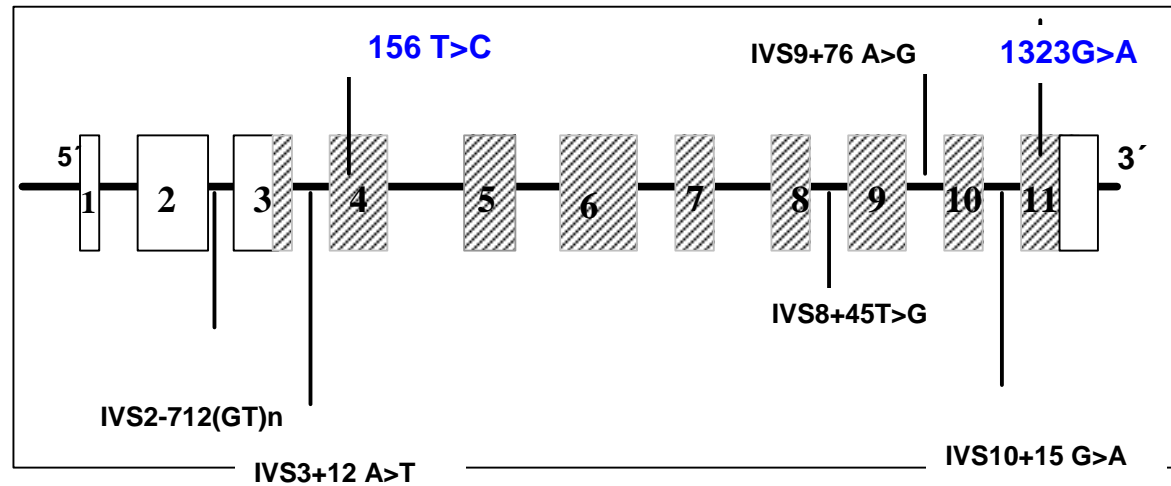


Figura 5 - Representação da localização dos polimorfismos exônicos (azul) e intrônicos (preto) do *GABRA1*. A porção hachurada (éxons 3 a 11) corresponde a região codificadora do gene.

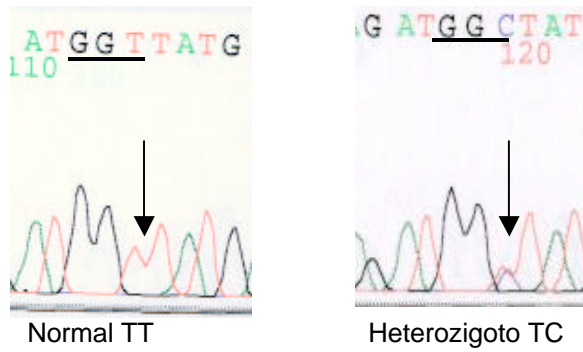


Figura 6 - Polimorfismo exônico silencioso 156T>C em heterozigose, localizado no éxon 4 do *GABRA1*. Ocorre a substituição do terceiro nucleotídeo do códon 52 (Gly).

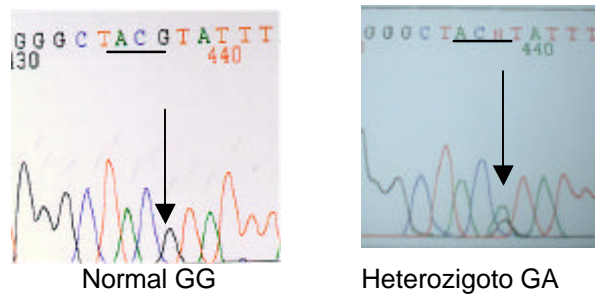


Figura 7 - Polimorfismo exônico silencioso 1323G>A em heterozigose, localizado no éxon 11 do *GABRA1*. Ocorre a substituição do terceiro nucleotídeo do códon 441 (Thr).

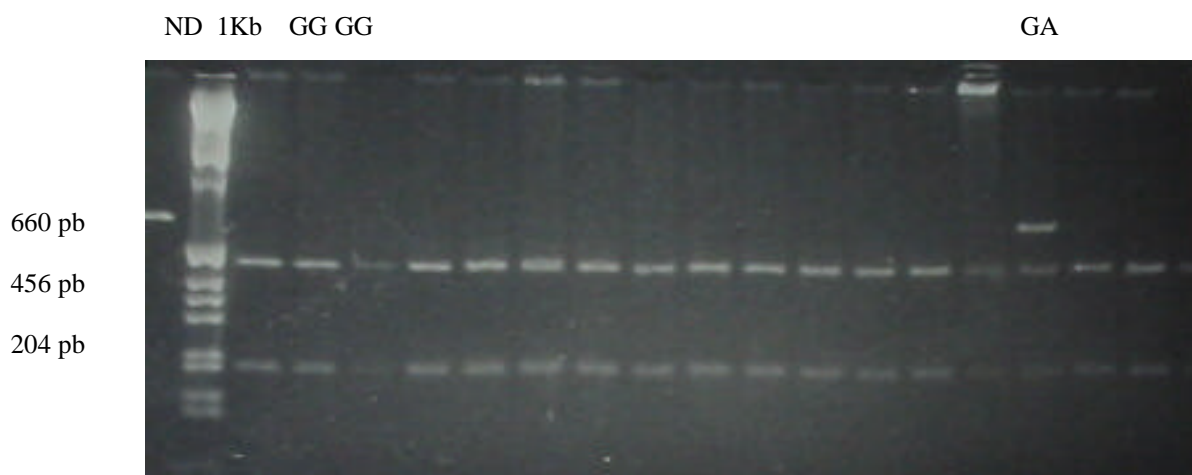
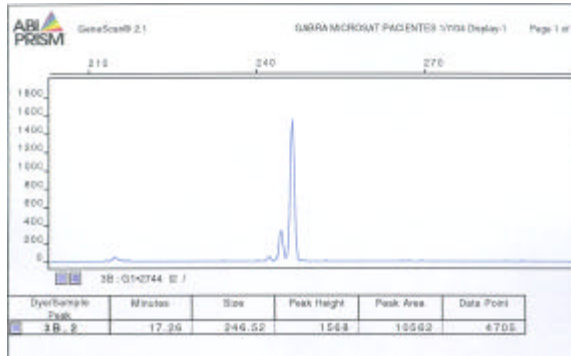


Figura 8 – Digestão enzimática para estudo do polimorfismo 1323 G>A em controles. Gel de agarose 3% demonstrando os produtos da digestão do fragmento correspondente ao éxon 11 (660pb). A presença do alelo G cria um sítio de restrição para a enzima *TaI* e observa-se 2 fragmentos (456 e 204 pb). A presença do alelo A em heterozigose elimina este sítio de restrição em um dos alelos, gerando 3 bandas (660 pb, 456 pb 3 204 pb).

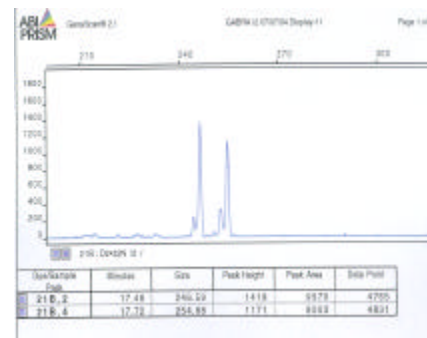
ND – não digerido

1Kb – marcador de peso molecular

A-



B-



C-

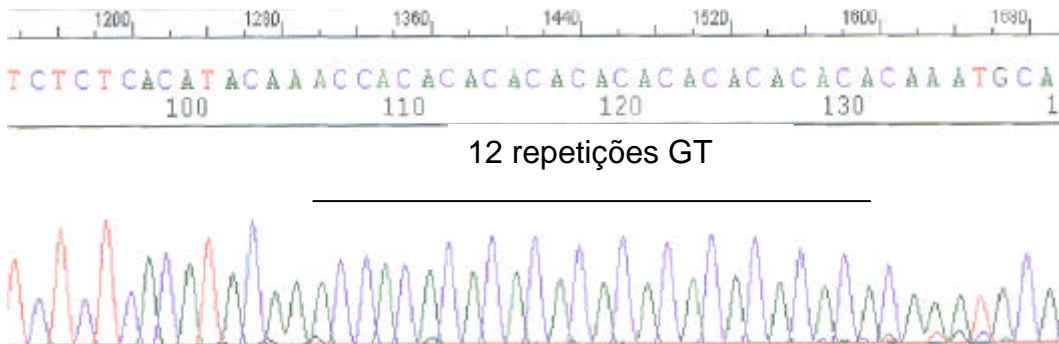
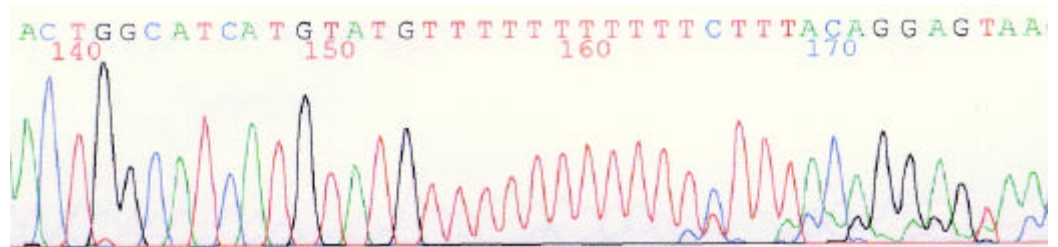


Figura 9 – Estudo do polimorfismo IVS2-712(GT)_n, localizado no íntron 2. Resultados obtidos pelo programa GeneScan (A e B) e pelo sequenciamento automático (C). A- Fragmento de 247 pb em homozigose B- Fragmentos de 247 e 251 pb em heterozigose. C- Sequenciamento automático do fragmento de 247 pb estabelecendo a sua correspondência com 12 repetições (GT).

A-



B-

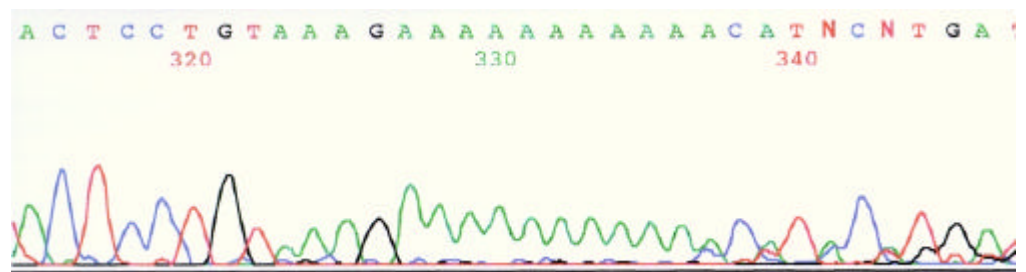


Figura 10 – Artefato no sequenciamento automático de uma região rica em base timina (T) no íntron 9, posicionada de -9 a -19 em relação ao exon 10. Sequenciamento com oligo sense (A) e com oligo anti sense (B).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grumbach MM. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res.* 2002;57(2):2-14.
2. Plant TM, Barker-Gibb M. Neurobiological mechanisms of puberty in higher primates. *Hum Reprod Update.* 2004;10(1):67-77.
3. Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological mechanism of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev.* 2001; 22:111-151.
4. Steele RE, Weisz J. Changes in sensitivity of estradiol-LH feedback system with puberty in the female rat. *Endocrinology.* 1974;95:513-520.
5. Plant TM. Gonadal regulation of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release in primates *Endocr Rev.*1986;7:75-88.
6. Chongtammakun S, Claypool LE, Teresawa E. Ovariectomy increases *in vivo* LHRH release in pubertal but not prepubertal, female *Rhesus* monkeys. *J Endocrinol.* 1993;5:41-50.
7. Cheung CC, Thornton JE, Kuijper JL, Weigle DS, Clifton DK, Steiner RA. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology.*1997;138:855-858.
8. Mantzoros CS, Flier JS, Rogol AD. A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. Rising leptin levels may signal the onset of puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:1066-1070.
9. Klein KO, Larmore KA, De Lancey E, Brown JM, Considine R, Hassink SG. Effect of obesity on estradiol level, and its relationship to leptin, bone maturation, and bone mineral density in children. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83:3469-3475.
10. Gill MS, Hall CM, Tillmann V, Clayton PE. Constitutional delay in growth and puberty (CDGP) is associated with hypopeptinaemia. *Clin Endocrinol* 1999;50:721-726.
11. Andreelli F, Haneire-Broutin H, Laville M, Tauber JP, Riou JP, Thivolet P. Normal reproductive function in leptin-deficient patients with lipotrophic diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.*2000;85:715-719
12. Ozata M, Ozdemir IC, Licinio J. Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin

and spontaneous correction of leptin-mediated defects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:3686-3695.

13. Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gourmelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougneres P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998;392:398-401.
14. Palmert MR, Boepple PA. Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:2364-68.
15. Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon JP. The Timing of Normal Puberty and Age Limits of Sexual Precocity: Variations around the World. Secular Trends. And Changes after Migration. *Endocr Rev.* 2003;24(5):668-93.
16. De Vries L, Kauschansky A, Shohat M, Phillip M. Familial Central Precocious Puberty Suggests Autosomal Dominant Inheritance *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004;89:1794 –1800.
17. Kalantaridou SN, Chrousos GP. Monogenic Disorders of Puberty *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:2481–2494.
18. Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt AS, Gusella JF, O’Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF.Jr, Aparicio SA, Colledge WH. The *GPR54* Gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med.* 2003;349(17):1614-27.
19. Partsch CJ, Heger S, Sippell WG. Management and outcome of central precocious puberty. *Clin Endocrinol.* 2002;56:129-148.
20. Mitsushima D, Hei DL, Terasawa E. GABA is an inhibitory neurotransmitter restricting the release of luteinizing hormone-releasing hormone before the onset of puberty. *Proc Natl Acad Sci.* 1994; 91:395-399.
21. Keen KL, Burich AJ, Mitsushima D, Kasuya E, Teresawa E. Effects of pulsatile infusion of the GABA_A receptor blocker bicuculline on the onset of puberty in female Rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;140:5257-5266.
22. Elmajdoubi M, Sahu A, Ramaswamy S, Plant TM. Neuropeptide Y: a Hypothalamic brake restraining the onset of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97:6179-6184.

23. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child*. 1969;44:291-303.
24. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child*. 1969; 45:13-23.
25. Brito VN, Batista MC, Borges MF, Latronico AC, Kohek MBF, Thirone ACP, Jorge BH, Arnhold IJP, Mendonca BB. Diagnostic Value of Fluorometric Assays in the Evaluation of Precocious Puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:3539-44.
26. Mitsushima D, Marzban F, Luchansky LL, Burich AJ, Keen KL, Durning M, Golos TG, Terasawa E. Role of glutamic acid decarboxylase in the prepubertal inhibition of the luteinizing hormone-releasing in prepubertal female monkeys. *J Neurosci*. 1996;16:2563-2573.
27. Mitsushima D, Kimura F. The maturation of GABA_A receptor mediated control of luteinizing hormone secretion in immature male rats. *Brain Res* 1997;748:258-262.
28. Kaila K. Tonic basis of GABA_A receptor channel function in the nervous system. *Prog Neurobiol*. 1994;42:489-537.
29. DeFazio RA, Heger S, Ojeda SR, Moenter SM. Activation of A-Type – Aminobutyric Acid Receptors Excites Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Molecular Endocrinol*. 2002;16:2872-91.
30. Defazio RA, Keros S, Quick MW, Hablitz JJ. Potassium-coupled chloride cotransport controls intracellular chloride in rat neocortical pyramidal neurons *J Neurosci*. 2000;20:8069-8076.
31. Brooks-Kayal AR, Pritchett DB. Developmental changes in human γ -aminobutyric acid A receptor subunit composition. *Ann. Neurol*. 1993;34:687-693.
32. Terasawa E, Luchansky LL, Kasuya E, Nyberg CL. An increase in glutamate release follows a decrease in γ -aminobutyric acid and the pubertal increase in luteinizing hormone release in female Rhesus monkeys. *J Neuroendocrinol*. 1999;11:275-282.
33. Mitsushima D, Hei DL, Terasawa E. GABA is an inhibitory neurotransmitter restricting the release of luteinizing hormone-releasing hormone before the onset of puberty. *Proc Natl. Acad. Sci*. 1994;91:395-399.
34. Le Novere N, Changeux JP. The ligand gated ion channel database. *Nucleic Acids Research*. 1999; 27(1):340-342.

35. Le Novère N, Changeux JP. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol.* 1995;40(2):155-72.
36. Ortells MO, Lunt GG. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci.* 1995;18(3):121-7.
37. Buckle VJ, Fujita N, Ryder-Cook AS, Derry JM, Barnard PJ, Lebo RV, Schofield PR, Seeburg PH, Bateson AN, Darlison MG. Chromosomal localization of GABAA receptor subunit genes: relationship to human genetic disease. *Neuron.* 1989;3(5):647-54.
38. Johnson KJ, Sander T, Hicks AA, Van Marle A, Janz D, Mullan MJ, Riley BP, Darlison MG. Confirmation of the localization of the human GABA-A receptor alpha-1-subunit gene (GABRA1) to distal 5q by linkage analysis. *Genomics.* 1992;14:745-8.
39. Russek SJ. Evolution of GABA-A receptor diversity in the human genome *Gene.* 1999;227:213-222.
40. Kash TL, Jenkins A, Kelley JC, Trudell JR, Harrison NL. Coupling of agonist binding to channel gating in the GABA-A receptor. *Nature* 2003;421:272-5.
41. Laidlaw J. Catamenial epilepsy. *Lancet* 1956:1235.
42. Elian M. EEG, epilepsy and precocious puberty. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1970;28:642.
43. Olsen RW, Avoli M. GABA and epileptogenesis. *Epilepsia.* 1997;38:399-407.
44. Liu N, Grumbach MM, De Napoli RA, Morishima A. Prevalence of electroencephalographic abnormalities in idiopathic precocious puberty and premature pubarche: bearing on pathogenesis and neuroendocrine regulation of puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 1965;25:1296-1308.
45. Theodore WH, Comite F, Sato S, Loriaux L, Cutler G. EEG and evoked potentials in precocious puberty. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1983;55(1):69-72.
46. Visser AS, Wolters FL, Gubbens-Stibbe JM, Van Der Graaf PH, Peletier LA, Danhof M. Mechanism-based pharmacokinetic/ pharmacodynamic modeling of the electroencephalogram effects of GABA_A receptor modulators: in vitro – in vivo correlations. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 304(1):88-101.

47. Koop C, Rudolph U, Low K, Tobler I. Modulation of rhythmic brain activity by diazepam: GABA(A) receptor subtype and state specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(10):3674-9. Epub 2004 Feb 27.
48. Edenberg HJ, Dick DM, Xuei X, Tian H, Almasy L, Bauer LO, Crowe RR, Goate A, Hesselbrock V, Jones K, Kwon J, Li TK, Nurnberger JI Jr, O'Connor SJ, Reich T, Rice J, Schuckit MA, Porjesz B, Foroud T, Begleiter H. Variations in *GABRA2*, encoding the alpha 2 subunit of the GABA(A) receptor are associated with alcohol dependence and with brain oscillations. *Am J Hum Genet*. 2004;74(4):705-14. Epub 2004 Mar 12.
49. Bourguignon JP, Jaeken J, Gerard A, Zegher F. Amino Acid Neurotransmission And Initiation Of Puberty: Evidence From Nonketotic Hyperglycinemia in a Female Infant and Gonadotropin-releasing hormone secretion by rat hypothalamic explants *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:1899-1903.
50. El-Khayat HÁ, Shatla HM, Ali GKH, Abdulgani MO, Tomoum HU, Attya HA. Physical and hormonal profile of male sexual development in epilepsy. *Epilepsia* 2003; 44(3):447-452.
51. Rattya J, Vainionpaa L, Knip M, Lanning P, Isojarvi JIT. The effects of valproate, carbamazepine and oxcarbazepine on growth and sexual maturation in girls with epilepsy. *Pediatrics* 1999;103(3):588-593.
52. Isojarvi JIT, Laatikainen TJ, Parakiren AJ, Juntunen KTS, Myllyla VV. Polycystic ovaries and hyperandrogenism in women taking valproate for epilepsy. *N Engl J Med* 1993;329:1381-1388.
53. Horiuchi Y, Nakayama J, Ishiguro H, Ohtsuki T, Detera-Wadleigh SD, Toyota T, Yamada K, Nankai M, Shibuya H, Yoshikawa T, Arinami T. Possible Association between a Haplotype of the GABA-A Receptor Alpha 1 Subunit Gene (*GABRA1*) and Mood Disorders. *Biol Psychiatry*. 2004;55:40-5.
54. Lee PA. Laboratory monitoring of children with precocious puberty. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994;148:369-376.
55. Brito VN, Latronico AC, Arnhold IJP, Mendonca BB. A single LH determination 2 hours after depot leuprolide is useful for therapy monitoring in girls with gonadotropin-dependent precocious puberty. *J Clin. Endocrinol. Metab* 2004; 89:4338-4342.
56. Greulich WW, Pyle SI. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. 2nd ed, Stanford University Press. Stanford. 1959.

57. Rogatko A, Pereira CAB, Frota-Pessoa O. A Bayesian method for the estimation of penetrance: application to mandibulofacial and frontonasal dysostoses. *Am J Med Genet* 1986; 24(2):231-246.
58. Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1215.
59. Steve R, Skaletsky H. Primer3 on the W.W.W. for general user and for biologist programmers. In Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press. Totowa, NJ. Pp 365-386. Source code available at <http://fokker.wi.mit.edu/primer3>
60. Reese MG, Eeckman, FH, Kulp D, Haussler D. Improved Splice Site Detection in Genie. *J Comp Biol* 1997; 4(3): 311-23.
61. Jasper HH. Report of the committee on methods of clinical examination in electroencephalography. *Electroenceph Clin Neurophysiol.* 1958;10:370-5.
62. Osheroff WP, Beard WA, Yin S, Wilson SH, Kunkel TA. Minor groove interactions at the DNA polymerase β active site modulate single-base deletion error rates. *J. Biol. Chem.* 2000;36:28033-8.
63. Yamada K, Watanabe A, Iwayama-Shigeno Y, Yoshikawa T. Evidence of association between gamma-aminobutyric acid type A receptor genes located on 5q34 and female patients with mood disorders. *Neuroscience Letters.* 2003; 349:9-12.
64. Cossette P, Liu L, Brisebois K, Dong H, Lortie A, Vanasse M, Saint-Hilaire JM, Carmant L, Verner A, Lu WY, Wang YT, Rouleau GA. Mutation of *GABRA1* in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet.* 2002;31:184-189.
65. Gullapalli D, Fountain NB. Clinical correlation of occipital intermittent rhythmic delta activity. *J Clin Neurophysiol.* 2003;20(1)35-41.