

**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 <sub>A</sub> .....	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) <sub>n</sub> nas meninas com a forma idiopática de PPDG e nos controles.....	52
Tabela 7 -	Distribuição genotípica do polimorfismo IVS2-712(GT) <sub>n</sub> nas meninas com a forma idiopática de PPDG e nos controles.....	53
Tabela 8 -	Comparação entre os genótipos com e sem o alelo (GT) <sub>12</sub> nas meninas com a forma idiopática de PPDG e nos controles.....	54
Tabela 9 -	Comparação entre os genótipos com e sem o alelo (GT) <sub>17</sub> 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) <sub>n</sub> nas pacientes com PPDG com EEG normal e anormal.....	57
Tabela 13 -	Frequência alélica do polimorfismo IVS2-712(GT) <sub>n</sub> 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) <sub>n</sub> , 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 <sub>A</sub>	Receptor tipo A do GABA
<i>GABRA1</i>	Gene que codifica a subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA <sub>A</sub>
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 <sub>m</sub>	RNA mensageiro
SNC	Sistema Nervoso Central
T	Timina
Thr	Treonina



## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

