

HELTON ESTRELA RAMOS

**DISGENESIAS TIROIDIANAS: ESTUDO CLÍNICO E PESQUISA
MOLECULAR DOS GENES CANDIDATOS *PAX8*, *RECEPTOR DE TSH* E
NKX2.5 EM PACIENTES COM HIPOTIROIDISMO CONGÊNITO**

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para a
obtenção do título de Doutor em Ciências

São Paulo

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

HELTON ESTRELA RAMOS

DISGENESIAS TIROIDIANAS: ESTUDO CLÍNICO E PESQUISA
MOLECULAR DOS GENES CANDIDATOS *PAX8*, *RECEPTOR DE TSH* E
NKX2.5 EM PACIENTES COM HIPOTIROIDISMO CONGÊNITO

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de São Paulo –
Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Orientador: Prof. Dr. Rui Monteiro de Barros Maciel

Co-orientadora: Profa. Dra. Gisah Amaral de Carvalho

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Endocrinologia: Prof. Dr. Sérgio A. Dib

Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação: Profa. Helena B. Nader

São Paulo, 2007

Ficha Catalográfica

Ramos, Helton Estrela

Disgenesias tiroidianas: estudo clínico e pesquisa molecular dos genes candidatos PAX8, receptor de TSH e NKX2.5 em pacientes com hipotireoidismo congênito / Helton Estrela Ramos --São Paulo, 2007

viii, 109p

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós Graduação em Ciências.

Título em inglês: Thyroid dysgenesis: Clinical and Molecular Aspects

1. Disgenesia tiroidiana 2. Hipotireoidismo congênito. 3. Desenvolvimento da Tiróide. 4. Hipoplasia da tiróide 5. PAX8 6. recetor de TSH 7. NKX2.5

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

1. Orientador: Rui Monteiro de Barros Maciel, Professor-Titular, Disciplina de Endocrinologia, Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Membros:

2. Hans Graf, Professor Adjunto, Disciplina de Endocrinologia, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Paraná

3. Célia Regina Nogueira, Professora Livre-Docente, Disciplina de Endocrinologia, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

4. Denise Pires de Carvalho, Professora Adjunta, Programa de Fisiologia e Biofísica Celular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro

5. Luiza K. Matsumura, Médica-Assistente Doutora, Disciplina de Endocrinologia, Departamento de Medicina, UNIFESP

Suplentes:

1. Rosa Paula Melo Biscolla, Professora Adjunta, Disciplina de Endocrinologia, Departamento de Medicina, UNIFESP

2. Meyer Knobel, Professor Livre-Docente, Disciplina de Endocrinologia, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Zelito e Walnice pelo imenso apoio e amor. Por todo esforço, dedicação e cuidado que vocês sempre tiveram comigo. Ao meu irmão Helvio pela torcida e espírito batalhador. À minha irmã Heve, à qual não tenho nem como agradecer por tanta cumplicidade, amizade, carinho e participação em todos os momentos da minha vida. Obrigado por suportarem a saudade e a distância e por sempre estarem ao meu lado.

Ao Prof. Dr. Hans Graf que sempre incentivou, apoiou e estimulou meu crescimento profissional. Definitivamente, um amigo, mentor e exemplo a seguir por toda a minha vida. A quem eu admiro por sua profunda capacidade de liderança, inteligência e humildade.

À Profa. Dra. Gisah Carvalho por sua constante presença, participação ativa e preocupação com a minha formação. Tenho muito orgulho e privilégio em poder seguir seus passos e contar com sua companhia alegre e energizante.

Ao Prof. Dr. Rui M. B. Maciel, que acreditou no meu potencial e capacidade de trabalho. Por quem possuo imenso respeito e que me impressiona pelo seu caráter, paciência e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A vida é mesmo um complexo experimento científico. Para sermos felizes, precisamos acertar e não repetir os mesmos erros, observar, interpretar, testar hipóteses, cooperar, ter muita perseverança e vontade de aprender. Minha família é meu grande laboratório. Lá eu aprendi sobre respeito, amor e honestidade. Minha mãe é a bancada principal, onde realizo e anoto os resultados mais preciosos. Meu pai é uma verdadeira universidade e meus irmãos são cadernos com fórmulas infalíveis e valiosas. Recebi deles um diploma de graduação de valor incalculável. Em meio a dúvidas e questionamentos, encontrei um admirável *guideline* que sempre me esclarece tudo e está presente quando mais preciso – Hans Graf. Ainda assim, sua maior aprendiz – Gisah – está sempre por perto a repassar os principais capítulos. Em busca de conhecimentos, fui bem sucedido ao encontrar no meu orientador – Rui Maciel – a sabedoria e brilhantismo necessários para entender o que realmente se passa nas entrelinhas dos complicados teoremas e tratados. Mais fácil foi entender sobre dedicação ao conviver com Samuel Refetoff. Utilizando reagentes cuidadosamente manufaturados pela Dra. Suzana Nesi-França e todos da UEP/UFPR, encontrei no laboratório da UNIFESP um ambiente perfeito, transbordando calor humano, que acabou propiciando condições favoráveis para uma replicação genômica de idéias, bem-estar e alegria. Com a ajuda de enzimas amigas catalisadoras como a Giza, Jussara, Hilda, Graziela, Dani Setúbal, Melissa, Marlos, Nick, Ariane, Silvio, Lie e Dani Rosa, foi possível repetir, insistir e dividir os resultados das mais divertidas ou dramáticas etapas desta caminhada. Cofatores de transcrição como Dona Maria e Waldir permitem, no dia-a-dia, uma melhor compreensão do real significado dos resultados obtidos e me ajudam a definir novas direções; enquanto o João me acompanha e com ele fica mais fácil não se distrair no caminho. No final, diante de uma ebulição de memórias e sentimentos, o produto é um coração cheio de gratidão e contentamento. O experimento de viver prossegue, mas a análise estatística já mostra que toda a diferença quem faz são vocês.

ÍNDICE

1. Apresentação e objetivos	9
2. Introdução e Manuscrito "Genética e Mecanismos Moleculares da Morfogênese da Tiróide: Uma Nova Abordagem na Disgenesia Tiroidiana"	18
3. Manuscrito ""Clinical and Molecular Analysis of Thyroid Hypoplasia: a Population-based Approach in Southern Brazil"	58
4. Manuscrito "NKX2.5 missense mutations are associated with thyroid ectopy: a study of 157 patients with thyroid dysgenesis"	82
5. Conclusões e Sugestões	106

APRESENTAÇÃO E OBJETIVOS

APRESENTAÇÃO

Nesta tese de doutorado apresentamos 3 trabalhos completos relacionados a aspectos moleculares das disgenesias tiroidianas, fruto da cooperação entre grupos de pesquisa das Universidades Federais de São Paulo (UNIFESP) e Paraná (UFPr), na linha de pesquisa sobre patogenia, diagnóstico e tratamento do hipotireoidismo congênito, em projetos financiados pela Fundação de Apoio à Pesquisa no Estado de São Paulo, FAPESP (Auxílio à pesquisa 06/54950-6, "Disgenesia tiroidiana: estudo clínico e rastreamento de mutações de genes candidatos *TITF1*, *PAX8*, *FOXE1*, *NKx2-5* E *TSHr* em 601 pacientes com hipotireoidismo congênito") e Fundação Araucária (Programa de Pesquisa para o SUS 9348: Estudo molecular da disgenesia tiroidiana: aspectos clínicos e moleculares da disgenesia tiroidiana como causa do hipotireoidismo congênito).

Os trabalhos são:

1. "Genética e Mecanismos Moleculares da Morfogênese da Tiróide: Uma Nova Abordagem na Disgenesia Tiroidiana", de autoria de Helton E. Ramos, Suzana Nesi-França e Rui M. B. Maciel, submetido aos Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia;
2. "Clinical and Molecular Analysis of Thyroid Hypoplasia: a Population-based Approach in Southern Brazil", de autoria de Helton E. Ramos, Suzana Nesi-França, Valter T. Boldarine, Rosana M. Pereira, Hans Graf, Luiz de Lacerda, Gisah A. Carvalho e Rui M. B. Maciel, submetido à revista *Clinical Endocrinology*;
3. "NKX2.5 missense mutations are associated with thyroid ectopy: a study of 157 patients with thyroid dysgenesis", de autoria de Helton E. Ramos, Valter T. Boldarine, Suzana Nesi-França, Cleber P. Camacho, Gustavo S. Guimarães, Magnus R. Dias da Silva, Hans Graf, Luís de Lacerda, Gisah A. Carvalho e Rui M. B. Maciel, submetido à revista *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.

Desta forma, para esta tese, realizamos estes estudos colaborativos empregando, por

um lado, a experiência acumulada do Laboratório de Endocrinologia Molecular da Disciplina de Endocrinologia da UNIFESP no diagnóstico molecular de doenças da tireóide (1–9), cujo grupo também tinha sido pioneiro no desenvolvimento de técnicas de rastreamento e na criação da legislação do hipotireoidismo congênito no Brasil, participando de sua implantação em várias cidades brasileiras, como São Paulo, Ribeirão Preto, Rio de Janeiro e Brasília (10–22); por outro lado, a casuística bem documentada da Unidade de Endocrinologia Pediátrica da UFPR que, em cooperação com a Fundação Ecumênica de proteção ao Excepcional (FEPE), desenvolveu no Estado do Paraná um sistema bem estruturado de rastreamento e seguimento do hipotireoidismo congênito, referência nacional e o primeiro a ser credenciado pelo Ministério da Saúde (23). Praticamente todas as crianças detectadas pelo programa têm o diagnóstico confirmado e são seguidas regularmente. Várias teses e notas prévias têm analisado aspectos clínicos e operacionais do programa, além da avaliação psicológica das crianças (23–34). Desta forma, quando procuramos estudar a patogênese molecular das disgenesias tireoidianas, optamos por utilizar as crianças que constituem a coorte do Programa do Estado do Paraná pelo diagnóstico etiológico preciso dos pacientes com hipotireoidismo congênito, além do excelente seguimento e facilidade de contato com os pais e familiares.

No Paraná a pesquisa do hipotireoidismo congênito é realizada pela FEPE, com a determinação primária do TSH do sangue coletado do calcanhar na alta do recém-nascido. Atualmente, com a nova portaria do Ministério da Saúde 822/01, a FEPE examina em média 180.000 crianças por ano e a prevalência da doença é de 1 caso para cada 4.000 nascidos vivos analisados. O Programa abrange todos os 399 municípios do Paraná, com 480 hospitais ou maternidades e 800 unidades básicas de saúde cadastradas. O seguimento dos recém-nascidos diagnosticados pelo programa é realizado pela Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFPR, sob a responsabilidade de uma das investigadoras deste projeto, a Dra. Suzana Nesi-França. Até o momento o programa diagnosticou 689 pacientes com HC; destes, 129 foram classificados como hipotireoidismo transitório e a absoluta maioria dos demais está em tratamento pela mesma equipe. Esforços têm sido empreendidos para melhorar o atendimento ambulatorial, principalmente no que se

refere à idade do início do tratamento, com média de 70 dias entre 1991 a 1993 e evoluindo para 45 dias em 1994 e 15 dias em 2006.

OBJETIVOS

Os objetivos desta tese são:

1. caracterizar clinicamente as crianças portadoras de Disgenesia Tiroidiana (DT) provenientes da coorte com diagnóstico definitivo de hipotireoidismo congênito do Programa de Rastreamento do Hipotireoidismo Congênito do Estado do Paraná, respondendo especificamente às seguintes questões: a) classificá-las em subgrupos específicos de DT com base nos dados obtidos por cintilografia e ultra-sonografia; b) definir a prevalência de sexo em cada subgrupo de DT; c) estabelecer a prevalência de malformações cardíacas em cada subgrupo de DT; d) definir o padrão hormonal de cada subgrupo de DT;
2. rastrear mutações dos genes candidatos, *PAX8*, receptor de TSH (*TSH-R*) e *NKX2.5* no subgrupo de pacientes portadores de hipoplasia tiroidiana;
3. rastrear mutações do gene *NKX2.5* em pacientes com disgenesia tiroidiana apresentando doença tiroidiana isolada ou associada a doença cardíaca congênita.

Nos trabalhos completos apresentados a seguir teremos, primeiramente, uma introdução e atualização ao tema das disgenesias tiroidianas com o manuscrito "Genética e Mecanismos Moleculares da Morfogênese da Tiróide: Uma Nova Abordagem na Disgenesia Tiroidiana"; a seguir, o manuscrito "Clinical and Molecular Analysis of Thyroid Hypoplasia: a Population-based Approach in Southern Brazil" responderá aos objetivos 1 e 2 da tese; finalmente, o manuscrito "NKX2.5 missense mutations are associated with thyroid ectopy: a study of 157 patients with thyroid dysgenesis " responderá ao objetivo 3.

Referências da Apresentação e Objetivos

1. Biscolla RPM, Cerutti JM, Maciel RMB. Detection of recurrent thyroid cancer by sensitive nested RT-PCR of thyroglobulin and sodium/iodine symporter messenger RNA transcripts in peripheral blood. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 2000; 85: 3623–3627
2. Dias da Silva MR, Cerutti JM, Arnaldi LAT, Maciel RMB. A mutation in the *KCNE3* potassium channel gene is associated with susceptibility to thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 2002; 87: 4881–4884
3. Álvares da Silva AM, Maciel RMB, Dias da Silva MR, Toledo SRC, Carvalho MB, Cerutti JM. A Novel Germline Point Mutation in *RET* Exon 8 (Gly533Cys) in a Large Kindred with Familial Medullary Thyroid Carcinoma. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 2003; 88: 5438–5443
4. Arnaldi LAT, Borra RC, Maciel RMB, Cerutti JM. Gene expression profiles reveal that DCN, DIO1 and DIO2 are underexpressed in benign and malignant thyroid tumors. **Thyroid** 2005; 15: 210–221
5. Guimarães GS, Latini F, Camacho CP, Maciel RMB, Dias-Neto E, Cerutti JM. Identification of candidates for tumor-specific alternative splicing in the thyroid. **Genes, Chromosomes and Cancer** 2006; 45: 540–553
6. Cerutti JM, Delcelo R, Amadei MJ, Nakabashi C, Maciel RMB, Peterson B, Shoemaker J, Riggins GJ. A preoperative diagnostic test that distinguishes benign from malignant thyroid carcinoma based on gene expression. **Journal of Clinical Investigation** 2004; 113: 1234–1242
7. Nakabashi CCD, Guimaraes GS, Michaluart Jr. P, Ward LS, Cerutti JM, Maciel RMB. The expression of PAX8-PPAR γ rearrangement is not specific to follicular thyroid carcinoma. **Clin Endocrinol** 2004; 61: 280–282
8. Cerutti JM, Latini FRM, Nakabashi C, Delcelo R, Andrade VP, Maciel RMB et al. Diagnosis of suspicious thyroid nodules using four protein biomarkers. **Clinical Cancer Research** 2006; 12: 3311–3318

9. Tamanaha R, Camacho CP, Ikejiri ES, Maciel RMB, Cerutti JM. *Y791F* RET mutation and early onset of medullary thyroid carcinoma in a Brazilian kindred: evaluation of phenotype-modifying effect of germline variants. **Clin Endocrinol (Oxf)**. 2007; 67:806–808
10. Maciel RMB. "Tiróide fetal", in "Fisiologia Fetal Aplicada" de Marcelo Zugaib e Moisés Kanas, Livraria Roca Ltda., São Paulo, 1986, pp. 107–125
11. Menabó E. Tese de Mestrado, orientada por RMB Maciel. "Determinação de tirotrófina (TSH) e tiroxina (T4) em sangue total seco colhido em papel de filtro: metodologia e aplicação em programas de detecção de hipotireoidismo congênito", apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Endocrinologia Clínica da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 1986
12. Maciel RMB, Vieira JGH, Russo EMK, Kunii I, Menabó E, Alves MLA, Matsumura LK, Ward LS, Zanella MT, Iazigi N. "Neonatal thyroid Screening in Brazil: the pilot experience of Escola Paulista de Medicina and Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, University of São Paulo, in "Clinical Endocrinology", editado por RMR Meirelles, A Machado e LC Póvoa, Excerpta Medica, Amsterdam, 1988, pp. 145–148
13. Matsumura LK, Kunii I, Maciel. "Transient hypothyroidism on neonates", in "Clinical Endocrinology", editado por RMR Meirelles, A Machado e LC Póvoa, Excerpta Medica, Amsterdam, 1988, pp. 153–156
14. Ward LS, Zanella MT, Menabó E, Ramos LR, Castelo-Filho A, Vieira JGH, Russo EMK, Maciel RMB. "Estimativa da relação custo-benefício de um programa de detecção precoce de hipotireoidismo congênito". **Rev Ass Méd Brasil** 1988; 34: 106–110
15. Maciel RMB. "Neonatal thyroid screening in Brazil: the pilot experience of Escola Paulista de Medicina", in "Current Trends in Infant Screening", editado por BJ Schmidt, AJ Diamant e NS Loghin-Grosso, Excerpta Medica, Amsterdam, 1989, pp. 117–120
16. Menabó E, Vieira JGH, Russo EMK, Miranda WL, Kunii IS, Maciel RMB. "Determinação da tiroxina (T4) em sangue total seco colhido em papel de filtro: desenvolvimento da metodologia e aplicação em programas de detecção precoce de hipotireoidismo congênito". **Arq Brasil Endocrinol Metab** 1989; 33: 76–80

17. Menabó E, Vieira JGH, Russo EMK, Kunii IS, Miranda WL, Maciel RMB."Determinação da tirotrófina (TSH) em sangue total seco colhido em papel de filtro: desenvolvimento da metodologia e aplicação em programas de detecção precoce de hipotireoidismo congênito". **Arq Brasil Endocrinol Metab** 1990; 34: 17-22
18. Meirelles RMR, Maciel RMB, Machado-Filho A, Castro AS."Subsídios para regulamentação das leis que estabelecem a obrigatoriedade do diagnóstico do hipotireoidismo congênito e fenilcetonúria **Arq Brasil Endocrinol Metab** 1991; 35: 12-14
19. Vieira JGH, Kunii IS, Nishida SK, Matsumura LK, Russo EMK, Maciel RMB."Desenvolvimento de um método imunofluorimétrico para a dosagem de tirotrófina humana (TSH) no soro e em sangue total colhido em papel de filtro". **Arq Brasil Endocrinol Metab** 1992; 36: 7-12
20. Franco DB. Tese de Mestrado orientada por RMB Maciel. "Estudo piloto da implantação do programa de rastreamento do hipotireoidismo congênito na Fundação Hospitalar do Distrito Federal: metodologia, resultados, dificuldades e propostas", apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Endocrinologia da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 1992
21. Franco DB, Maciel RMB, Matsumura LK, Kunii IS, Kuruzawa GK, Vieira JGH. Implantação do programa de rastreamento do hipotireoidismo congênito na Fundação Hospitalar do Distrito Federal: metodologia, resultados, dificuldades e propostas. Estudo comparativo com recém-natos de outros estados. **Arq Brasil Endocrinol Metab** 1997; 41: 6-13
22. Ward LS, Maciel RMB, Magalhães RF, Kunii IS, Kurazawa GK, Matsumura LK, Vieira JGH. Comparação entre duas estratégias para a detecção precoce do hipotireoidismo congênito. **Rev Ass Med Brasil** 1998; 44: 81-6
23. Nesi-França S. Rastreamento Neonatal do Hipotireoidismo Congênito. **Arq Bras Endocrinol Metab** 1997; 41: Editorial II
24. Leal SO, Pelaez JM, Lara F, Senn CCPO, Pereira RM, Meireles AC, De Lacerda L, Nesi-França S. Avaliação do Desenvolvimento Neuropsicomotor (DNPM) em Crianças com Hipotireoidismo Congênito (HC). **Arq Bras Endocrinol Metab** 2003; 47: S76

25. Nesi-França S, Mesa Junior CO, De Lacerda L, Graf H. Comparação entre Ecografia e Cintilografia na Investigação de 150 pacientes com Hipotireoidismo Congênito (HC). **Arq Bras Endocrinol Metab** 2003; 47: S76
26. Silva Lacerda R, Gugish RC, Fraiz FC, Nesi-França S, Marques-Pereira R, Domingos MT et al. Comparison between Dental Age, Bone Age and Height Status in Children With Congenital Hypothyroidism. **J Ped Endocrinol Metab** 2004; 17: 1347
27. Pelaez JM, Graf H, Lara F, Marques-Pereira R, Domingos MT, Mader MJ et al. Neuropsychological Evaluation of Congenital Hypothyroidism. **J Ped Endocrinol Metab** 2004; 17: 1348
28. Nesi-França S, Marques-Pereira R, Pavan-Senn C, Leal SO, Nakagiri M, Fonteles AVR et al. Congenital Hypothyroidism Screening Program in the State of Paraná (Southern Brazil): An Overview of 542 Cases Detected and Evaluated since 1990. **J Ped Endocrinol Metab** 2004; 17: 1349
29. Pavan-Senn C, Marques-Pereira R, Domingos MT, Lara F, Pelaez JM, Sandrini F et al. Transient Alterations of TSH and/or T4 Detected by Congenital Hypothyroidism Screening Program. Preliminary Results. **J Ped Endocrinol Metab** 2004; 17: 1349
30. Nesi-França S. Triagem Neonatal para Hipotireoidismo Congênito no Estado do Paraná. 2004 Capítulo de Livro, Hipotireoidismo Congênito no Brasil - Como era, Como estamos, Para onde vamos.
31. Pelaez J, Graf H, Lara F, Marques-Pereira R, Domingos M, Wittig E et al. Neuropsychological evaluation of Congenital Hypothyroidism. **Horm Research** 2005; 64 (Suppl 1): 110
32. Meneguel JF, Nesi-França S, Kopelman BI. Prevenção da Deficiência Mental: Prevenção Pós-Natal. 2005 Deficiência Mental: Abordagem Multidisciplinar. Instituto APAE
33. Nesi-França S, Marques-Pereira R, Pavan-Senn C, Leal SO, Nakagiri M, Fonteles AVR et al. Triagem Neonatal Para Hipotireoidismo Congênito (HC) no Estado do Paraná - Avaliação de 601 Casos Detectados em 14 anos. **Rev Med Minas Gerais** 2005; 15 (2 Supl 1): S83

34. Pavan-Senn C, Marques-Pereira R, Domingos MT, Lara F, Pelaez JM, Sandrini F et al. Hipotireoidismo Transitório Detectado Pelo Programa de Triagem Neonatal. **Rev Med Minas Gerais** 2005; 15 (2 Supl 1): S83

Trabalho 1, submetido aos Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia

**NOVOS ASPECTOS DA GENÉTICA E DOS MECANISMOS MOLECULARES DA
MORFOGÊNESE DA TIRÓIDE PARA O ENTENDIMENTO DA DISGENESIA
TIROIDIANA**

Helton E. Ramos, Suzana Nesi-França e Rui M. B. Maciel

NOVOS ASPECTOS DA GENÉTICA E DOS MECANISMOS MOLECULARES DA MORFOGÊNESE DA TIRÓIDE PARA O ENTENDIMENTO DA DISGENESIA TIROIDIANA

Helton E. Ramos, Suzana Nesi-França e Rui M. B. Maciel

Laboratório de Endocrinologia Molecular, Disciplina de Endocrinologia, Departamento de Medicina, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (HER, RMBM), São Paulo, SP; Disciplina de Endocrinologia, Departamento de Clínica Médica (HER) e Unidade de Endocrinologia Pediátrica (SN-F), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR; Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (SN-F), Curitiba, PR

Título abreviado: Genética da disgenesia tireoidiana

Título em inglês: Genetics and thyroid dysgenesis

Correspondência: Professor Rui M.B Maciel

Laboratório de Endocrinologia Molecular, Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP

Rua Pedro de Toledo, 781. 12º Andar

Sao Paulo, SP Brasil 04039-032

Tel. +55-011-50815233 FAX. +55-011-50845231

email: rmbmaciel-endo@pesquisa.epm.br

Keywords: Thyroid dysgenesis, Congenital hypothyroidism, Thyroid development

Palavras-chave: Disgenesia tireoidiana, Hipotireoidismo congênito, Desenvolvimento da Tireóide

Abstract

The elucidation of the molecular mechanisms underlying the very early steps of thyroid organogenesis and the etiology of most cases of thyroid dysgenesis are poorly understood. Many genes have been identified as important contributors to survival, proliferation and migration of thyroid cells precursors, acting as an integrated and complex regulatory network. Moreover, by generation of mouse mutants, the studies have provided better knowledge of the role of these genes in the thyroid morphogenesis. In addition, it is likely that a subset of patients has thyroid dysgenesis as a result of mutations in regulatory genes expressed during embryogenesis. This review summarizes molecular aspects of thyroid development, describes the animal models and phenotypes known to date and provides information about novel insights into the ontogeny and pathogenesis of human thyroid dysgenesis.

Resumo

A organogênese da tiróide ainda não está completamente elucidada, assim como também não se sabe o mecanismo patogênético da maioria dos casos de disgenesias tiroidianas. Vários genes têm sido identificados como importantes para a sobrevivência, proliferação e migração dos precursores das células tiroidianas e tem se demonstrado que eles atuam de modo integrado. Além disso, por meio da criação de camundongos mutantes, diversos estudos têm trazido um entendimento melhor para o papel destes genes na morfogênese tiroidiana. Finalmente, tem-se também evidenciado que mutações em alguns destes genes são responsáveis pelo desenvolvimento de disgenesias tiroidianas em crianças com hipotireoidismo congênito. O objetivo desta revisão é sumarizar os aspectos moleculares do desenvolvimento tiroidiano, descrever os modelos animais e respectivos fenótipos e oferecer novas informações sobre a ontogenia e a patogênese das disgenesias tiroidianas humanas.

Introdução

O Hipotireoidismo congênito (HC) é a endocrinopatia congênita mais comum, afetando cerca de 1:3000–4000 recém-nascidos (RN) (1). Um grupo heterogêneo de doenças relacionadas às alterações no desenvolvimento da tiróide, conjuntamente denominadas Disgenesias Tiroidianas (DT), responsabiliza-se por aproximadamente 85% de todos os casos de HC. Tradicionalmente, as DT são subdivididas em subgrupos: agenesia ou atireose, hemiagenesia, ectopia e hipoplasia; contudo, não nos parece satisfatória uma classificação baseada unicamente em aspectos morfológicos, uma vez que fenótipos semelhantes podem ser oriundos de eventos moleculares distintos. Nos últimos anos, a descoberta de genes (especialmente fatores de transcrição envolvidos na diferenciação das células foliculares tiroidianas) e outros mecanismos implicados na morfogênese tiroidiana, possibilitaram um maior esclarecimento sobre as bases genéticas da ontogênese tiroidiana. Entretanto, apenas 5% dos pacientes com DT apresentam mutações nos genes candidatos identificados: receptor do TSH (*TSHR*), *PAX8*, *TTF1* e *FOXE1*, indicando que sua patogênese é ainda muito mais complexa (1). Esta frequência baixa de mutações nas populações estudadas pode ser explicada pelo fato de que as análises são, na sua maioria, limitadas às regiões codificadoras dos genes e, portanto, não excluíam mutações potenciais existentes em outras regiões regulatórias, aspectos pós-zigóticos ou, mesmo, a existência de fenômenos epigenéticos como causa de DT (1). Adicionalmente, a ampla variabilidade fenotípica encontrada e a presença invariável de penetrância incompleta nos casos familiares apontam, ainda, para possíveis mecanismos multigênicos de herança não mendeliana (2). Portanto, apesar dos avanços recentes na compreensão de muitas etapas do desenvolvimento tiroidiano, um montante considerável de aspectos etiopatogênicos estão ainda bastante obscuros. Do ponto de vista clínico, um melhor entendimento dos mecanismos de controle morfogenéticos da tiróide seria extremamente relevante, uma vez que os distúrbios de desenvolvimento da glândula são responsáveis pela maioria

dos casos de HC. Este artigo de revisão visa sumarizar novos conhecimentos adquiridos a partir do estudo de modelos animais e de pacientes com DT, discutindo aspectos já estabelecidos e enfatizando os pontos ainda enigmáticos no entendimento do desenvolvimento normal da tiróide e de sua fisiopatologia molecular.

Genética do Desenvolvimento Tiroidiano Normal

Especificação

No embrião humano, a tiróide é o primeiro órgão endócrino a se desenvolver. Em sua forma madura compõe-se de dois grupos celulares distintos, com origens embrionárias diferentes, denominados células foliculares tiroidianas (CFT) e células parafoliculares (ou células C). Um espessamento do epitélio endodérmico, localizado no assoalho da linha média da faringe embrionária, correspondente à base da língua, abriga um conjunto de células que representa as CFT primordiais ou primórdio tiroidiano. Esta estrutura primitiva pode ser observada por volta do E8–8.5 em camundongos e E20–22 em humanos. As CFT primordiais, a esta altura, já apresentam uma assinatura molecular específica – a coexpressão única de quatro fatores de transcrição: Hhex, Ttf1, Pax8 e Foxe1 – que as diferencia de células do epitélio endodérmico vizinho (3). Este processo, onde as células primordiais recebem uma programação definida de mudanças morfológicas e moleculares a serem seguidas com a finalidade de se tornarem CFT chama-se especificação ou determinação (4). Não se conhece o mecanismo controlador, moléculas ou genes responsáveis pela indução deste processo; acredita-se na hipótese de possível sinalização oriunda do mesênquima adjacente ou do endotélio do saco aórtico primitivo (4). Portanto, problemas na etapa de especificação deveriam gerar agenesia tiroidiana (total ausência da glândula) como conseqüência do grave defeito de organogênese. Modelos animais com inativação específica de genes essenciais para a formação do intestino primitivo como Nodal, fatores de transcrição reguladores do Nodal, FGF4, membros da família GATA ou Sox, e que, portanto, seriam potenciais candidatos a reguladores da especificação, ao serem estudados, não foram completamente informativos. Na grande maioria destes modelos animais há interrupção do processo de desenvolvimento embrionário antes mesmo do surgimento do primórdio tiroidiano (5). Outros possíveis genes candidatos, mas ainda

não identificados, seriam fatores de transcrição responsáveis pelo início da expressão e controladores dos genes Hhex, Ttf1 e Pax8 (5).

Formação do broto tiroidiano embrionário

Por volta do E9.5 em camundongos e E24 em humanos, o primórdio tiroidiano invagina-se e invade o mesênquima adjacente, formando, no E10.5 em camundongos e no E26 em humanos, uma estrutura alongada conhecida como broto tiroidiano primitivo. Este processo de crescimento e brotamento do primórdio tiroidiano envolve, evidentemente, um aumento muito rápido do número de células progenitoras, porém recentemente demonstrou-se que isto não parece acontecer por proliferação celular, mas possivelmente por recrutamento de células do endoderma vizinho (4). Em seguida, o broto tiroidiano assume formato de divertículo e migra caudalmente em direção ao mesênquima. Nesta etapa, o divertículo tiroidiano ainda se comunica com o epitélio faríngeo por uma estrutura estreita, o ducto tiroglossos, que se desfaz gradualmente e desaparece por volta do E11.5 no camundongo e do E37 em humanos, quando a tireóide primitiva perde definitivamente a comunicação com o assoalho faríngeo (3).

Problemas na rede de interação gênica durante a especificação e brotamento tiroidiano podem significar prejuízo importante na sobrevivência e proliferação das CFTs primordiais. É justamente nesta fase que as CFTs caracterizam-se pela co-expressão singular de fatores de transcrição importantes para a morfogênese: Hhex, Pax8, Ttf1 e Foxe1. Modelos animais transgênicos de inativação destes genes oferecem informações valiosas para o mecanismo de disgenesia. Na realidade, o estudo de animais mutantes para Hhex, Ttf1 e Pax8 permite observar que a morfogênese tiroidiana inicia-se, mas em seguida, ocorre involução e subsequente desaparecimento do broto tiroidiano primitivo. Discutiremos a importância de cada fator de transcrição na próxima seção.

Migração do primórdio tiroidiano

Por volta do E13–14 em camundongos e E44–48 em humanos, a tiróide primitiva alcança seu posicionamento final, anteriormente à traquéia e inferiormente à cartilagem cricóide, quando finalmente funde-se com os corpos ultimobranquiais que contém as células derivadas da crista neural e precursoras das células C. Todo esse processo de migração dura, em humanos, 4 semanas e sua base genética já é parcialmente compreendida, com participação importante do fator de transcrição Foxe1, reforçando a idéia de uma migração ativa, ao invés de um simples processo de transporte passivo por remodelação (6). Alguns outros eventos morfológicos da região cervical e oral podem ainda contribuir no direcionamento da tiróide primitiva para a sua localização final (7). A figura 1 ilustra alguns aspectos da migração e organogênese.

Lobulação e Foliculogênese

Nos E14–15 em camundongos e E60–70 em humanos, a tiróide primitiva tem formato semi-circular e já possui dois lobos rudimentares paratraqueais. Em seguida, os lobos laterais crescem e a glândula assume seu formato final: dois lobos conectados por um estreito istmo. No E15.5 do camundongo e E50 de humanos, inicia-se o processo de formação de folículos rudimentares – foliculogênese. Qualquer problema no processo chamado de lobulação pode comprometer a organogênese e a glândula, ao final, pode não formar os dois lobos simetricamente – hemiagenesia. Os mecanismos controladores da formação de lobos, organogênese e da proliferação celular nesta etapa, ainda são obscuros. Estudos recentes em modelos animais apontam para a influência do gene Shh (sonic hedgehog) e de outras diversas interações celulares envolvendo genes expressos em tecidos adjacentes (8, 9). Recentemente, um modelo animal de dupla heterozigose para a inativação de Titf1 (Titf1^{+/-}) e Pax8 (Pax8^{+/-}), denominado DHTP, mostrou elevada frequência de hemiagenesia (2).

Diferenciação funcional e hormonogênese

O processo de diferenciação completa-se apenas quando a glândula atinge sua localização final; porém, esta localização normal não é exatamente um requisito absoluto para que as CFTs completem sua diferenciação funcional plena; isto explica o fato de pacientes com glândula ectópica sublingual produzirem normalmente o hormônio tireoidiano (HT), porém, em menor quantidade (1). A diferenciação funcional inicia-se por volta de E14.5 e é consequência da expressão, obedecendo um padrão temporal, de proteínas essenciais para a produção do HT: Tg, TPO, Tshr, NIS, DUOX e Pendrina. Os mecanismos de controle desta etapa ainda estão sob investigação e a existência de uma ordem temporal definida indica que mecanismos genéticos possam ter influência. Em seguida, não ocorre adicional diferenciação nas CFTs e, portanto, esta etapa é também denominada de diferenciação terminal. As CFTs, então, já iniciam sua expressão de genes específicos e essenciais para a biossíntese do HT e isto ocorre obedecendo um padrão temporal estritamente preciso, que se inicia em E14.5 com Tg, TPO e Tshr e, em seguida, em E16, com NIS (sodium/iodide symporter). O início da produção de T4 já pode ser observado no E16.5 (Tabela 1) (1).

Expansão da tiróide fetal

Nesta etapa existe uma taxa proliferativa alta do tecido tireoidiano embrionário que proporciona grande aumento do seu tamanho e, ao mesmo tempo, a expressão de características próprias da arquitetura da glândula. No camundongo, o eixo hipotálamo-hipofisário exerce regulação completa do crescimento e função da tiróide somente após o nascimento. Já em seres humanos, a tiróide apresenta uma estrutura folicular organizada por volta de 10-11 semanas de gestação e aumenta de volume até o termo, sendo que o eixo hipotálamo-hipófise-tireoidiano já funciona durante a gestação. No animal adulto, a via AMPc induzida por TSH é o regulador principal do crescimento tireoidiano. Todos os modelos animais de inativação do Tshr ou seus ligantes apresentam invariavelmente uma glândula hipoplásica na fase adulta. O modelo de animal transgênico que, na tiróide, super-expressa o receptor A2 de adenosina, e sendo

assim, apresenta ativação constitutiva da adenilciclase, apresenta hiperplasia notável da tiróide na fase adulta (10). Contudo, no período embrionário E17, no contexto de ausência de Tshr funcional, o tamanho da glândula e o número de tirócitos permanecem inalterados e não se reduzem (11); adicionalmente, no mesmo modelo transgênico que possui aumento de expressão do receptor A2 de adenosina, o volume tiroidiano não se altera no período embrionário e encontra-se normal até o nascimento (10). Concluímos, portanto, que, no feto, o crescimento da glândula é controlado por mecanismos independentes da sinalização TSH-Tshr-AMPC; porém, os mecanismos implicados ainda não foram completamente esclarecidos. Interessantemente, animal heterozigoto duplo para inativação de Titf1 e Pax8 apresenta defeito de organogênese da tiróide, com fenótipo de hipoplasia evidenciada tão cedo quanto E15 e que persiste até o nascimento. Sendo assim, é possível que fatores de crescimento regulados por Titf1 e Pax8 estejam envolvidos na proliferação de tirócitos imaturos na fase de crescimento da tiróide fetal (2).

Modelos Animais de Disgenesia Tiroidiana (Tabela 2)

Titf1

Titf1 (Nkx2-1 ou T/EBP) é um fator de transcrição da família Nkx2 codificado por gene localizado no cromossomo 12 em camundongos e 14q13 em humanos. Durante a vida embrionária, o Titf1 expressa-se no primórdio tiroidiano, traquéia, pulmão, cérebro e neuro-hipófise (1). Animais com mutação inativadora do Titf1 (*Titf1^{-/-}*) apresentam fenótipo complexo, caracterizado por morte neonatal, agenesia tiroidiana, hipoplasia pulmonar, morfologia alterada da traquéia, alterações cerebrais e ausência da hipófise (12). O primórdio tiroidiano, identificado em fases mais precoces do desenvolvimento embrionário (E9), forma-se plenamente e é absolutamente normal. Contudo, em fases mais tardias, por volta do E10.5, a tiróide primitiva já apresenta significativa redução volumétrica e de expressão de Pax8, Foxe1 e Hhex. Subsequentemente, o primórdio tiroidiano desaparece (E13), dando lugar somente a células apoptóticas. Compatível com o conhecido padrão de expressão de Titf1, ocorre desaparecimento não só das CFT, mas também das células C e das células epiteliais do corpo ultimobranquial (13). Portanto, Titf1 não é verdadeiramente necessário para a etapa de especificação, mas fundamental para a proliferação e sobrevivência dos dois tipos celulares; esta função é comprovadamente dose-dependente (fenômeno de haploinsuficiência), pois os animais *Titf1^{+/-}* apresentam incoordenação motora associada a leve hipertirotrópinemia com níveis normais de T4 e fusão anormal dos corpos ultimobranquiais com a tiróide primitiva (13, 14). As vias genéticas controladas pelo Titf1 não estão esclarecidas. Sabe-se que a ausência do Titf1 determina, no embrião, a falta de expressão de genes como Bmp4 (Bone morphogenetic protein 4) e Fgf8 (fibroblast growth factor 8) nos pulmões e hipófise, respectivamente (15). Portanto, paralelamente, o Titf1 poderia controlar a sobrevivência das CFTs através de mecanismos semelhantes, envolvendo alguns fatores de crescimento. Consistente com esta hipótese é o fato de que o gene *Fgfr2* tem sua expressão no primórdio tiroidiano por volta de E11 e animais *knockout* para este

receptor apresentam agenesia tiroídiana (15). A proteína Ttf1 é definitivamente regulada de forma tecido-específica, participando da regulação de diferentes genes em distintos tipos celulares. Na tiróide, além da importância embrionária, Ttf1 desempenha claro papel na expressão de genes específicos da tiróide na fase adulta.

Pax8

Pax8 (Paired Box gene 8) é membro de uma família de fatores de transcrição caracterizada pela presença de um domínio *paired domain* (Prd), constituído de 128 aminoácidos que se liga a sequências específicas do DNA. O Pax8, em células foliculares tiroídianas diferenciadas, reconhece e liga-se à região promotora de Tg e TPO e interage física e sinergisticamente com Ttf1, sugerindo existência de cooperação, entre os fatores de transcrição, no controle da diferenciação tiroídiana. No embrião, expressa-se precocemente no primórdio tiroídiano (E8.5), mielencéfalo e rins (4). Embriões de animais Pax8^{-/-} apresentam primórdio tiroídiano morfologicamente normal e comparável ao fenótipo selvagem nos estágios mais precoces. Mas, em estágios mais tardios, por volta de E11.5, apresentam primórdio tiroídiano francamente hipoplásico e com expressão reduzida de outros fatores de transcrição como Foxe1 e Hhex (5); e, ainda um dia mais tarde (E12.5), as CFT não são mais detectadas no primórdio primitivo. Animais Pax8^{-/-} apresentam tiróide rudimentar composta quase que exclusivamente por células C e morrem com 2–3 semanas de idade por hipotiroidismo grave e retardo de crescimento e desenvolvimento generalizados (ossos, intestino, baço), sendo que a administração de T4 evita a morte destes animais (5). Similarmente ao Ttf1, o Pax8 não é requisitado para a fase de especificação inicial, mas possui importância fundamental nas etapas seguintes do desenvolvimento e sobrevivência celular. O animal heterozigoto Pax8^{+/-} possui tiróide histológica e funcionalmente normal, diferindo portanto do fenótipo de DT encontrado em pacientes com mutações inativadoras em heterozigose (16). Recente estudo em modelo animal com dupla heterozigozidade para mutação no Pax8 e Ttf1 (Modelo DHTP) revela tiróide hipoplásica

durante a vida fetal com alta incidência de hemiagenesia e redução na síntese de tiroglobulina; interessante, este modelo de DT é específico da linhagem de animais C57BL/6, não sendo observado em animais com a linhagem 129/Sv, indicando possível atuação moduladora multigênica (2).

Hhex

Hhex (Hematopoietically expressed homeobox) é um fator de transcrição primeiramente identificado em células hematopoiéticas multipotentes, localizado nos cromossomos 19 e 10q23.32 em camundongos e humanos, respectivamente. É expresso no coração, cérebro, primórdio tireoidiano e em outros órgãos derivados do intestino primitivo (fígado, timo, pâncreas, pulmão). Em animais *Hhex*^{-/-}, no E9, o primórdio tireoidiano existe e a expressão de *Titf1*, *Pax8* e *Foxe1* é normal. Mais tardiamente (E10), o brotamento tireoidiano é grandemente prejudicado e existe apenas um pequeno número de células que não expressam *Titf1*, *Pax8* e *Foxe1*; em seguida, o primórdio tireoidiano desaparece ou apresenta-se gravemente hipoplásico. Portanto, parece que *Hhex*, como outros fatores de transcrição estudados, não são essenciais para a especificação, mas sim para a sobrevivência das células precursoras (1, 17). Nos embriões de animais *Titf1*^{-/-} e *Pax8*^{-/-}, *Hhex* é indetectável no remanescente tireoidiano, indicando a presença de uma rede de interação gênica entre estes fatores de transcrição.

Foxe1

Foxe1 (TTF2, thyroid transcription factor 2) é codificado por gene situado no cromossomo 4 em camundongos e 9q22 em humanos. Durante a vida embrionária expressa-se muito precocemente na tireóide, na bolsa de Rathke, língua e esôfago; mais tardiamente no palato, coanas e folículo piloso (18). A sua ausência nos animais *Foxe1*^{-/-} não determina defeito na especificação, porém compromete gravemente a migração e sobrevivência da tireóide primitiva: em E10 o primórdio tireoidiano ainda encontra-se

atracado no assoalho faríngeo e em estágios mais tardios existe apenas um pequeno número remanescente de CFT capazes de sintetizar Tg (indicando capacidade preservada de diferenciação) ou simplesmente agenesia completa (6). Esta variabilidade fenotípica pode ser explicada por eventos epigenéticos ou influência do "background" genético individual. O animal *Foxe1*^{-/-} morre nas primeiras 48 horas de vida e apresenta fenótipo de agenesia tiroídiana e hipotireoidismo grave associado à fenda palatina (responsável pela morte neonatal). Em outro modelo animal, onde a expressão do *Foxe1* restringiu-se à células do primórdio tiroídiano e é ausente no endoderma faríngeo (*Titf1*^{+/Foxe1}), há completa migração, demonstrando-se que este evento é autônomo e exclusivamente dependente do controle intrínseco e local exercido por *Foxe1* nas células precursoras da tiróide, não havendo interferência da ausência de *Foxe1* no endoderma faríngeo vizinho (5).

Shh

Shh (sonic hedgehog) codifica gene localizado no cromossomos 5 em camundongos e 7q36 em humanos. Não há expressão no primórdio tiroídiano, mas é amplamente detectado no epitélio do intestino primitivo, inclusive no assoalho faríngeo. Estudos com animais *Shh*^{-/-} indicam sua grande importância na organogênese de várias estruturas, incluindo a tiróide. Neste modelo animal, as etapas precoces da morfogênese tiroídiana não sofrem alteração, mas parece haver prejuízo no processo de lobulação: no E15, a tiróide primitiva aparece apenas como massa tecidual localizada em região paratraqueal (8). Como *Shh* ou seu receptor não são expressos em células tiroidianas, parece haver controle da lobulação através de mecanismos prejudicados na ausência de *Shh*. O desenvolvimento anormal de diversas estruturas vasculares próximas à tiróide que ocorre em animais *Shh*^{-/-} seria um mecanismo candidato. Esta hipótese é consistente com o relato de hemiagenesia em pacientes acometidos por doenças caracterizadas por defeitos vasculares e cardíacos congênitos como a Síndrome de Di George (19). Porém a base genética do processo de lobulação ainda precisa ser

amplamente explorada, possivelmente envolvendo fatores intrínsecos das CFT e do tecido adjacente (2).

Nkx2.5

Nkx2.5 é um fator de transcrição essencial para a morfogênese cardíaca e que se expressa precocemente no primórdio tireoidiano (E8.5–9.5) (1). A inativação do gene Nkx2.5 em animais resulta em morte precoce (E9.5) no período fetal por defeitos graves na formação do coração e especificação ventricular, e isto dificulta a análise da importância deste gene na morfogênese tireoidiana (20). Embriões de animais Nkx2.5^{-/-} apresentam primórdio tireoidiano hipoplásico se comparados ao tipo selvagem, mas não há alteração da expressão de outros fatores de transcrição (Pax8, Titf1 e Foxe1) (21).

Tshr

O Tshr (thyroid-stimulating hormone receptor) é um membro da família dos receptores acoplados à proteína G. Este receptor é detectado em células tireoidianas por volta do E15, simultaneamente à produção de TSH pelos tirotrofos da hipófise fetal e sua expressão aumenta consideravelmente a partir do E17. Os modelos animais disponíveis possibilitaram uma compreensão muito maior sobre a fisiologia do eixo hipotálamo-hipófise-tireoidiano durante a vida embrionária. Tanto o Tshr^{hyt}/Tshr^{hyt} (com mutação puntual espontânea no quarto domínio transmembrana do receptor) quanto o Tshr^{-/-} (com inativação do gene por recombinação homóloga em células tronco) apresentam hipotireoidismo grave após o nascimento associados à hipoplasia na vida adulta (11, 22). Na ausência de um Tshr funcional existe importante diminuição da expressão de NIS e TPO na tireóide fetal; portanto a sinalização via Tshr é de extrema importância no processo de diferenciação funcional. Entretanto a síntese de DNA e tamanho glandular, durante a vida fetal não parecem ser influenciados pelo Tshr, sugerindo mecanismos de controle diversos do tamanho da tireóide no feto e adulto (11).

Tbx1

Animais *Tbx1*^{-/-} exibem fenótipo de malformação vascular importante e, recentemente, é crescente a importância atribuída à influência dos grandes vasos *per se* ou de fatores reguladores e essenciais à vasculogênese na morfogênese tiroídiana. Acredita-se que a malformação vascular, direta ou indiretamente, possa contribuir ou causar um defeito de migração ou de formação tiroídiana. O animal *Tbx1*^{-/-} possui atraso na migração do divertículo tiroídiano em direção ao saco aórtico e isto acontece sem haver qualquer prejuízo na expressão do *Foxe1*, único fator de transcrição de importância reconhecida no processo de migração. O resultado da inativação do gene *Tbx1* é um fenótipo de alteração vascular associado à defeito de bilobação e glândula de volume reduzido (4, 23).

Outros genes

Alguns genes da família *Hox* de fatores de transcrição poderiam estar envolvidos na morfogênese tiroídiana. Inativação do gene *Hoxa5* gera fenótipo de hipotireoidismo neonatal e menor expressão embrionária dos fatores *Titf1*, *Pax8* e *Foxe1*, associadamente a defeito na foliculogênese e na produção de Tg (24). Especialmente o gene *Hoxa3*, que é detectado no assoalho faríngeo e primórdio tiroídiano, tem animal *knockout* que apresenta fenótipo de hipoplasia tiroídiana e de hipodesenvolvimento e migração anormal dos corpos ultimobranquiais, com conseqüente ausência do número de células C parafoliculares, associados à agenesia tímica e de paratiróide (25). O gene *Eya1*, apesar de presente nos corpos ultimobranquiais e não ser expresso no primórdio tiroídiano, gera fenótipo idêntico ao animal *knockout* para *Hoxa3*, indicando que o defeito na organogênese tiroídiana pode advir da ausência de fusão com os corpos ultimobranquiais durante a embriogênese (9). Um fenótipo idêntico é também observado em animais com mutação nos genes *Pax3* e *Endothelin-1*, que são fundamentais para o desenvolvimento de estruturas derivadas da crista neural, fato que corrobora o conceito de interação importante e crítica entre os corpos ultimobranquiais

e o divertículo tiroidiano (26, 27). O gene *Fgfr2* (fibroblast growth factor receptor 2), detectado após formação do primórdio tiroidiano (E1 1.5) e seu ligante *Fgf10* (fibroblast growth factor 10) parecem representar vias significativas de diferenciação e proliferação da tiróide durante a vida embrionária, uma vez que os animais knockout apresentam fenótipo de agenesia (15, 28).

Genética da Disgenesia Tiroidiana Humana

TTF1

Rastreamentos de mutação do TTF1 em populações de pacientes com DT apresentaram resultados negativos (29–31). Dada a importância fundamental deste gene na morfogênese pulmonar e cerebral observada no modelo animal *knockout*, presume-se que uma mutação inativadora em homozigose seria praticamente incompatível com a sobrevivência no período neonatal. De fato, os pacientes até então identificados, apresentam defeitos genéticos em heterozigose (deleção, inserção, mutação *nonsense* e *missense*) e quadro sindrômico que abrange problemas respiratórios no período neonatal (em alguns casos ausente ou com ampla variação de gravidade), distúrbios neurológicos (coreoatetose) e fenótipo tiroidiano variável entre eutiroidismo e HC (tiróide normal a hipoplásica) (14, 32–37). Na literatura, a análise de famílias estabelece forte relação com coréia hereditária benigna (distúrbio de movimento autossômico-dominante) (38). A imensa variação do fenótipo e a falta de correlação com a extensão do defeito genético indicam a presença de penetrância incompleta e influência de genes moduladores, assim como de fatores ambientais. Contudo, haploinsuficiência parece ser o mecanismo responsável pela presença de doença em indivíduos heterozigotos, assim como recentemente observado em estudo de animais *Titf1*^{+/-} (14).

PAX8

O gene *PAX8*, em humanos, localiza-se no cromossomo 2, possui 12 exons que codificam proteína de 450 aminoácidos. Cerca de 10 Mutações do gene *PAX8* (8 missense, 1 nonsense e 1 deleção) já foram descritas em casos esporádicos e familiares com transmissão autossômica dominante de HC com DT, todas em heterozigose (Tabela 3) (39–47). O fenótipo tiroidiano é bastante variável (leve a hipoplasia grave), mesmo entre indivíduos afetados membros de uma mesma família, indicando penetrância incompleta (40, 44).

FOXE1

A síndrome de Bamforth-Lazarus caracteriza-se por fenda palatina, atresia bilateral de coanas, epiglote bífida, alteração do couro cabeludo (cabelos espetados) e agenesia tireoidiana (48). O gene *FOXE 1* é expresso continuamente na tiróide desde o período embrionário e possui um único exon codificando uma proteína de 367 aminoácidos. Estudos recentes sugerem associação entre polimorfismos do gene e risco de DT (49). Entretanto, o rastreamento de mutação em indivíduos com DT e fenda palatina isolados ou em combinação não tiveram sucesso, sugerindo tratar-se de um defeito genético raro (50). Três mutações do gene *FOXE1* em homozigose, todas localizadas no domínio *forkhead* de ligação ao DNA, já foram descritas em 5 pacientes com HC: S57N, A65V e R102C (51–53). Indivíduos heterozigotos são normais e os portadores de mutações com atividade funcional parcialmente preservada apresentam fenótipo incompleto como ausência de atresia de coanas e de epiglote bífida (52). A última mutação descrita (R102C), em homozigose, foi encontrada em paciente com HC grave, ausência de concentração de iodo e tiroglobulina indetectável, mas associados à presença de tecido tireoidiano identificado por ultrasonografia (51).

NKX2.5

O gene que codifica *NKX2.5* em humanos localiza-se no cromossomo 5q34 e possui 2 exons codificando uma proteína de 324 aminoácidos. Estudos *in vitro* indicam que *NKX2.5* é um forte indutor de NIS e interage sinergisticamente com *TITF1*; além disso, a expressão de isoforma com ação dominante negativa (N188K) em células tireoidianas provocou redução na transcrição de genes específicos como pendrina e tiroglobulina (54,55). Uma vez que este gene é fundamental para a morfogênese e miogênese cardíaca, várias mutações inativadoras do gene *NKX2.5* já foram identificadas em pacientes com cardiopatia congênita, sendo que os defeitos de septo e distúrbios de condução figuram entre os fenótipos mais comumente encontrados (56–

59). Durante a embriogênese, parece haver íntima relação entre o desenvolvimento tireoidiano e cardiovascular, sobretudo referente ao processo de migração do primórdio tireoidiano (4,60). Recentemente, 3 mutações heterozigóticas inativadoras (R25C, A119S e R161P) foram descritas em 4 pacientes com DT (3 com ectopia e 1 com agenesia). Os estudos funcionais *in vitro* demonstraram redução de transativação, capacidade de ligação ao DNA e efeito dominante negativo das proteínas mutantes (21). Nosso grupo realizou o rastreamento de mutações do gene *NKX2.5* em uma população de 157 pacientes com DT (17 com cardiopatia congênita). Identificamos 4 novas mutações (D16E, A80G, D105E e L245I) e uma mutação previamente descrita (A119S) em 4 indivíduos (todos com ectopia) também sem estigmas de cardiopatia congênita (21).

TSH-R

O gene *TSH-R* tem 10 exons, codifica proteína de 765 aminoácidos e localiza-se no cromossomo 14q31. A porção extracelular amino-terminal é codificada por 9 exons, enquanto que os domínios transmembrana e citoplasmático são codificados por um único grande exon. Mutações inativadoras do gene *TSH-R*, em homozigose ou heterozigose composta, representam o achado genético mais comum em pacientes com DT. O espectro da manifestação fenotípica da hipossensibilidade ao TSH é grande, variando de hipertirotrópinemia leve ou hipotiroidismo subclínico a grave HC com profunda hipoplasia da glândula (61). Parte desta variabilidade clínica pode ser explicada por atividade funcional residual das moléculas mutantes de TSHR, influência moduladora de outros genes e diferenças no *background* genético (1). Nos casos familiares, a doença tem herança autossômica recessiva e indivíduos heterozigotos possuem fenótipo normal ou níveis de TSH levemente aumentados (61). O rastreamento de mutações no TSHR em casos esporádicos ou familiares de hipotiroidismo não auto-imune, mostrou que se trata de evento genético raro (62). Estudo recente de famílias com fenótipo de resistência ao TSH (RTSH), mas com padrão de herança autossômico

dominante de alta penetrância, após adequada investigação dos locus candidatos, indica provável implicação de novos mecanismos moleculares ou epigenéticos (63, 64).

Outros genes

O gene *Shh*, classicamente relacionado à holoprosencefalia (ausência do lobo frontal do cérebro do embrião) e malformação de estruturas da linha média (dismorfismos crânio-faciais, fenda palatina e alteração da morfogênese hipotálamo-hipofisária), possui diversas mutações descritas em casos isolados e familiares com herança autossômica dominante, com grande variabilidade fenotípica. A síndrome pode englobar diversos distúrbios endócrinos: diabetes insípido, hipoplasia adrenal, hipogonadismo e hipoplasia tireoidiana (65). O gene *TBX1* pode estar relacionado à Síndrome 22q11 (de Di George), que possui uma prevalência de hipotireoidismo em 20% dos seus casos, às vezes com manifestação tardia na vida adulta, sendo sugerido a deficiência do crescimento glandular (hipoplasia) como causa aparente. O quadro clínico é complexo, envolvendo malformação vascular, dismorfismos faciais e agenesia de timo e paratiróide. A investigação não sistemática do fenótipo tireoidiano, nos pacientes já descritos com esta síndrome, encontrou alguns casos de hemiagenesia, hipoplasia lobar e agenesia de istmo em estudos de autópsia (23, 66).

Conclusão

Os estudos em animais *knockout* e relatos de mutações humanas demonstram papel importante de alguns genes na embriogênese tireoidiana. Até o momento, 4 genes estão fortemente implicados: *TITF1*, *PAX8*, *FOXE1* e *TSH-R*. Os 3 primeiros, todos fatores de transcrição, muito conservados na escala zoológica (>90% de homologia entre camundongos e humanos), embora não específicos da tireóide, possuem coexpressão única no primórdio tireoidiano durante a embriogênese e que se mantém na fase adulta. O fenótipo em humanos geralmente assemelha-se ao encontrado no modelo animal correspondente, porém as mutações já encontradas explicam apenas uma parte muito limitada dos casos de DT. Mesmo se levando em conta que, na maioria das vezes, a análise é restrita à região codificadora do gene, é muito provável que outros genes não conhecidos estejam envolvidos. A exclusão dos já conhecidos genes candidatos, em um série de casos familiares reforçam esta hipótese (67). Além disso, o modo de transmissão da doença pode ser diferente entre animais e humanos. Em animais, linhagens *Pax8*^{+/-} apresentam fenótipo aparentemente normal, enquanto que linhagens *Titf1*^{+/-} possuem hipotireoidismo subclínico e distúrbios motores. Por outro lado, em humanos, indivíduos com mutações heterozigóticas para os mesmos genes homólogos apresentam quadro clínico de DT com herança autossômica dominante. Em modelos animais o gene *Foxe1* está fortemente implicado em defeito de migração, enquanto que em humanos, os casos de ectopia, que representam a maioria dos pacientes com DT, permanecem obscuros do ponto de vista genético, não sendo relacionados às poucas mutações descritas do *FOXE1*. Ainda existe controvérsia sobre o caráter passivo do processo de migração do primórdio tireoidiano e acredita-se que genes expressos no mesênquima vizinho deveriam ser também considerados candidatos na patogênese da ectopia (5). Analogicamente, na síndrome de Kalmann, onde existe distúrbio na migração de neurônios secretores do GHRH (gonadotropin-releasing hormone), o defeito genético advém de perda funcional de proteína extrínseca a estas

células endócrinas (68). Ultimamente uma importância crescente têm sido dada à influência dos vasos embrionários na organogênese tireoidiana, sugerindo que fatores vasculares devam ser adicionados à lista de genes candidatos (4, 60). Nossos dados recentes apontam uma possível associação de ectopia com o gene *NKX2.5*, fator de transcrição conhecidamente importante para a diferenciação e morfogênese cardiovascular, porém os mecanismos moleculares implicados são desconhecidos, podendo incluir interação com outros fatores de transcrição extrínsecos da tireóide, como os pertencentes à família Tbx (21, 69, 70).

A análise dos casos familiares descritos na literatura permite concluir que não existe um padrão de transmissão claramente mendeliano, havendo alta incidência de alterações subclínicas da morfogênese tireoidiana em familiares dos pacientes com DT (67). A variabilidade fenotípica intrafamiliar é evidente nos casos de mutações no *PAX8* e *TTF1*, indicando penetrância incompleta. Isto sugere um modelo de doença de origem multigênica que mais uma vez, recentemente, encontrou respaldo em modelo animal (DHTP). O número de genes candidatos é vasto e ainda largamente desconhecido. A tabela 2 resume os diversos genes, sendo a maioria fatores de transcrição ou de crescimento, capazes de produzir defeitos de organogênese tireoidiana em modelos animais.

A identificação de novos genes, principalmente se forem relacionados ao processo de especificação ou em fases mais precoces da organogênese, seria extremamente útil. Ainda assim, a DT ocorre predominantemente como doença esporádica (95% dos casos) e existe indubitável discordância na maioria dos casos documentados em gêmeos monozigóticos e uma forte preponderância no sexo feminino (principalmente para ectopia) (71, 72). Estes dados indicam que a DT, mesmo tendo causa genética, pode não ser hereditária e que mecanismos não mendelianos, como eventos pós-zigóticos e fenômenos epigenéticos podem estar envolvidos na sua patogênese (73).

Referências

1. De Felice M, Di Lauro R 2004 Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr Rev* 25:722–746
2. Amendola E, De Luca P, Macchia PE, Terracciano D, Rosica A, Chiappetta G, Kimura S, Mansouri A, Affuso A, Arra C, Macchia V, Di Lauro R, De Felice M 2005 A mouse model demonstrates a multigenic origin of congenital hypothyroidism. *Endocrinology* 146:5038–5047
3. Trueba SS, Auge J, Mattei G, Etchevers H, Martinovic J, Czernichow P, Vekemans M, Polak M, Attie-Bitach T 2005 PAX8, TITF1, and FOXE1 gene expression patterns during human development: new insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations. *J Clin Endocrinol Metab* 90:455–462
4. Fagman H, Andersson L, Nilsson M 2006 The developing mouse thyroid: embryonic vessel contacts and parenchymal growth pattern during specification, budding, migration, and lobulation. *Dev Dyn* 235:444–455
5. Parlato R, Rosica A, Rodriguez-Mallon A, Affuso A, Postiglione MP, Arra C, Mansouri A, Kimura S, Di Lauro R, De Felice M 2004 An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis. *Dev Biol* 276:464–475
6. De Felice M, Ovitt C, Biffali E, Rodriguez-Mallon A, Arra C, Anastassiadis K, Macchia PE, Mattei MG, Mariano A, Scholer H, Macchia V, Di Lauro R 1998 A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet* 19:395–398
7. Fagman H, Grande M, Edsbagge J, Semb H, Nilsson M 2003 Expression of classical cadherins in thyroid development: maintenance of an epithelial phenotype throughout organogenesis. *Endocrinology* 144:3618–3624

8. Fagman H, Grande M, Gritli-Linde A, Nilsson M 2004 Genetic deletion of sonic hedgehog causes hemiagenesis and ectopic development of the thyroid in mouse. *Am J Pathol* 164:1865–1872
9. Xu PX, Zheng W, Laclef C, Maire P, Maas RL, Peters H, Xu X 2002 *Eya1* is required for the morphogenesis of mammalian thymus, parathyroid and thyroid. *Development* 129:3033–3044
10. Ledent C, Dumont JE, Vassart G, Parmentier M 1992 Thyroid expression of an A2 adenosine receptor transgene induces thyroid hyperplasia and hyperthyroidism. *Embo J* 11:537–542
11. Postiglione MP, Parlato R, Rodriguez-Mallon A, Rosica A, Mithbaekar P, Maresca M, Marians RC, Davies TF, Zannini MS, De Felice M, Di Lauro R 2002 Role of the thyroid-stimulating hormone receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15462–15467
12. Van Vliet G 2003 Development of the thyroid gland: lessons from congenitally hypothyroid mice and men. *Clin Genet* 63:445–455
13. Kusakabe T, Hoshi N, Kimura S 2006 Origin of the ultimobranchial body cyst: *T/ebp/Nkx2.1* expression is required for development and fusion of the ultimobranchial body to the thyroid. *Dev Dyn* 235:1300–1309
14. Moeller LC, Kimura S, Kusakabe T, Liao XH, Van Sande J, Refetoff S 2003 Hypothyroidism in thyroid transcription factor 1 haploinsufficiency is caused by reduced expression of the thyroid-stimulating hormone receptor. *Mol Endocrinol* 17:2295–2302
15. Revest JM, Spencer-Dene B, Kerr K, De Moerlooze L, Rosewell I, Dickson C 2001 Fibroblast growth factor receptor 2-IIIb acts upstream of Shh and Fgf4 and is required for limb bud maintenance but not for the induction of Fgf8, Fgf10, Msx1, or Bmp4. *Dev Biol* 231:47–62
16. Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P 1998 Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet* 19:87–90

17. Martinez Barbera JP, Clements M, Thomas P, Rodriguez T, Meloy D, Kioussis D, Beddington RS 2000 The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development* 127:2433–2445
18. Dathan N, Parlato R, Rosica A, De Felice M, Di Lauro R 2002 Distribution of the *titf2/foxe1* gene product is consistent with an important role in the development of foregut endoderm, palate, and hair. *Dev Dyn* 224:450–456
19. Scuccimarri R, Rodd C 1998 Thyroid abnormalities as a feature of DiGeorge syndrome: a patient report and review of the literature. *J Pediatr Endocrinol Metab* 11:273–276
20. Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP 1995 Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev* 9:1654–1666
21. Dentice M, Cordeddu V, Rosica A, Ferrara AM, Santarpia L, Salvatore D, Chiovato L, Perri A, Moschini L, Fazzini C, Olivieri A, Costa P, Stoppioni V, Baserga M, De Felice M, Sorcini M, Fenzi G, Di Lauro R, Tartaglia M, Macchia PE 2006 Missense mutation in the transcription factor *NKX2-5*: a novel molecular event in the pathogenesis of thyroid dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1428–1433
22. Marians RC, Ng L, Blair HC, Unger P, Graves PN, Davies TF 2002 Defining thyrotropin-dependent and -independent steps of thyroid hormone synthesis by using thyrotropin receptor-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15776–15781
23. Fagman H, Liao J, Westerlund J, Andersson L, Morrow BE, Nilsson M 2007 The 22q11 deletion syndrome candidate gene *Tbx1* determines thyroid size and positioning. *Hum Mol Genet* 16:276–285
24. Meunier D, Aubin J, Jeannotte L 2003 Perturbed thyroid morphology and transient hypothyroidism symptoms in *Hoxa5* mutant mice. *Dev Dyn* 227:367–378

25. Manley NR, Capecchi MR 1998 Hox group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands. *Dev Biol* 195:1–15
26. Epstein JA 2000 Pax3 and vertebrate development. *Methods Mol Biol* 137:459–470
27. Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, Oda H, Kuwaki T, Cao WH, Kamada N, et al. 1994 Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 368:703–710
28. Celli G, LaRochelle WJ, Mackem S, Sharp R, Merlino G 1998 Soluble dominant-negative receptor uncovers essential roles for fibroblast growth factors in multi-organ induction and patterning. *Embo J* 17:1642–1655
29. Hishinuma A, Kuribayashi T, Kanno Y, Onigata K, Nagashima K, Ieiri T 1998 Sequence analysis of thyroid transcription factor-1 gene reveals absence of mutations in patients with thyroid dysgenesis but presence of polymorphisms in the 5' flanking region and intron. *Endocr J* 45:563–567
30. Lapi P, Macchia PE, Chiovato L, Biffali E, Moschini L, Larizza D, Baserga M, Pinchera A, Fenzi G, Di Lauro R 1997 Mutations in the gene encoding thyroid transcription factor-1 (TTF-1) are not a frequent cause of congenital hypothyroidism (CH) with thyroid dysgenesis. *Thyroid* 7:383–387
31. Perna MG, Civitareale D, De Filippis V, Sacco M, Cisternino C, Tassi V 1997 Absence of mutations in the gene encoding thyroid transcription factor-1 (TTF-1) in patients with thyroid dysgenesis. *Thyroid* 7:377–381
32. Devriendt K, Vanhole C, Matthijs G, de Zegher F 1998 Deletion of thyroid transcription factor-1 gene in an infant with neonatal thyroid dysfunction and respiratory failure. *N Engl J Med* 338:1317–1318
33. Iwatani N, Mabe H, Devriendt K, Kodama M, Miike T 2000 Deletion of NKX2.1 gene encoding thyroid transcription factor-1 in two siblings with hypothyroidism and respiratory failure. *J Pediatr* 137:272–276

34. Krude H, Schutz B, Biebermann H, von Moers A, Schnabel D, Neitzel H, Tonnies H, Weise D, Lafferty A, Schwarz S, DeFelice M, von Deimling A, van Landeghem F, DiLauro R, Gruters A 2002 Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency. *J Clin Invest* 109:475-480
35. Pohlenz J, Dumitrescu A, Zundel D, Martine U, Schonberger W, Koo E, Weiss RE, Cohen RN, Kimura S, Refetoff S 2002 Partial deficiency of thyroid transcription factor 1 produces predominantly neurological defects in humans and mice. *J Clin Invest* 109:469-473
36. Willemsen MA, Breedveld GJ, Wouda S, Otten BJ, Yntema JL, Lammens M, de Vries BB 2005 Brain-Thyroid-Lung syndrome: a patient with a severe multi-system disorder due to a de novo mutation in the thyroid transcription factor 1 gene. *Eur J Pediatr* 164:28-30
37. Moya CM, Perez de Nanclares G, Castano L, Potau N, Bilbao JR, Carrascosa A, Bargada M, Coya R, Martul P, Vicens-Calvet E, Santisteban P 2006 Functional study of a novel single deletion in the TITF1/NKX2.1 homeobox gene that produces congenital hypothyroidism and benign chorea but not pulmonary distress. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1832-1841
38. Breedveld GJ, van Dongen JW, Danesino C, Guala A, Percy AK, Dure LS, Harper P, Lazarou LP, van der Linde H, Joosse M, Gruters A, MacDonald ME, de Vries BB, Arts WF, Oostra BA, Krude H, Heutink P 2002 Mutations in TITF-1 are associated with benign hereditary chorea. *Hum Mol Genet* 11:971-979
39. Al Taji E, Biebermann H, Limanova Z, Hnikova O, Zikmund J, Dame C, Gruters A, Lebl J, Krude H 2007 Screening for mutations in transcription factors in a Czech cohort of 170 patients with congenital and early-onset hypothyroidism: identification of a novel PAX8 mutation in dominantly inherited early-onset non-autoimmune hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 156:521-529
40. Congdon T, Nguyen LQ, Nogueira CR, Habiby RL, Medeiros-Neto G, Kopp P 2001 A novel mutation (Q40P) in PAX8 associated with congenital hypothyroidism and

- thyroid hypoplasia: evidence for phenotypic variability in mother and child. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3962–3967
41. de Sanctis L, Corrias A, Romagnolo D, Di Palma T, Biava A, Borgarello G, Gianino P, Silvestro L, Zannini M, Dianzani I 2004 Familial PAX8 small deletion (c.989_992delACCC) associated with extreme phenotype variability. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5669–5674
 42. Grasberger H, Ringkananont U, Lefrancois P, Abramowicz M, Vassart G, Refetoff S 2005 Thyroid transcription factor 1 rescues PAX8/p300 synergism impaired by a natural PAX8 paired domain mutation with dominant negative activity. *Mol Endocrinol* 19:1779–1791
 43. Komatsu M, Takahashi T, Takahashi I, Nakamura M, Takahashi I, Takada G 2001 Thyroid dysgenesis caused by PAX8 mutation: the hypermutability with CpG dinucleotides at codon 31. *J Pediatr* 139:597–599
 44. Macchia PE, Lapi P, Krude H, Pirro MT, Missero C, Chiovato L, Souabni A, Baserga M, Tassi V, Pinchera A, Fenzi G, Gruters A, Busslinger M, Di Lauro R 1998 PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nat Genet* 19:83–86
 45. Meeus L, Gilbert B, Rydlewski C, Parma J, Roussie AL, Abramowicz M, Vilain C, Christophe D, Costagliola S, Vassart G 2004 Characterization of a novel loss of function mutation of PAX8 in a familial case of congenital hypothyroidism with in-place, normal-sized thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4285–4291
 46. Ramos HE, Boldarine VT, Nesi-França S, Chiamolera MI, Graf H, Carvalho GA, Maciel RMB 2007 Clinical and Molecular Analysis of Thyroid Hypoplasia: A population-based Study. In: *LATS Scientific Program and Abstract Book XII Congress Latin American Thyroid Society*, Santiago, Chile, pp. 35–36
 47. Vilain C, Rydlewski C, Duprez L, Heinrichs C, Abramowicz M, Malvaux P, Renneboog B, Parma J, Costagliola S, Vassart G 2001 Autosomal dominant

- transmission of congenital thyroid hypoplasia due to loss-of-function mutation of PAX8. *J Clin Endocrinol Metab* 86:234–238
48. Bamforth JS, Hughes IA, Lazarus JH, Weaver CM, Harper PS 1989 Congenital hypothyroidism, spiky hair, and cleft palate. *J Med Genet* 26:49–51
 49. Carre A, Castanet M, Sura-Trueba S, Szinnai G, Van Vliet G, Trochet D, Amiel J, Leger J, Czernichow P, Scotet V, Polak M 2007 Polymorphic length of FOXE1 alanine stretch: evidence for genetic susceptibility to thyroid dysgenesis. *Hum Genet*
 50. Tonacchera M, Banco M, Lapi P, Di Cosmo C, Perri A, Montanelli L, Moschini L, Gatti G, Gandini D, Massei A, Agretti P, De Marco G, Vitti P, Chiovato L, Pinchera A 2004 Genetic analysis of TTF-2 gene in children with congenital hypothyroidism and cleft palate, congenital hypothyroidism, or isolated cleft palate. *Thyroid* 14:584–588
 51. Baris I, Arisoy AE, Smith A, Agostini M, Mitchell CS, Park SM, Halefoglu AM, Zengin E, Chatterjee VK, Battaloglu E 2006 A novel missense mutation in human TTF-2 (FKHL15) gene associated with congenital hypothyroidism but not athyreosis. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4183–4187
 52. Castanet M, Park SM, Smith A, Bost M, Leger J, Lyonnet S, Pelet A, Czernichow P, Chatterjee K, Polak M 2002 A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate. *Hum Mol Genet* 11:2051–2059
 53. Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P, Crisp MS, John R, Lazarus JH, Ludgate M, Chatterjee VK 1998 Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat Genet* 19:399–401
 54. Dentice M, Luongo C, Elefante A, Ambrosio R, Salzano S, Zannini M, Nitsch R, Di Lauro R, Rossi G, Fenzi G, Salvatore D 2005 Pendrin is a novel in vivo downstream target gene of the TTF-1/Nkx-2.1 homeodomain transcription factor in differentiated thyroid cells. *Mol Cell Biol* 25:10171–10182

55. Dentice M, Luongo C, Elefante A, Romino R, Ambrosio R, Vitale M, Rossi G, Fenzi G, Salvatore D 2004 Transcription factor Nkx-2.5 induces sodium/iodide symporter gene expression and participates in retinoic acid- and lactation-induced transcription in mammary cells. *Mol Cell Biol* 24:7863-7877
56. Benson DW, Silberbach GM, Kavanaugh-McHugh A, Cottrill C, Zhang Y, Riggs S, Smalls O, Johnson MC, Watson MS, Seidman JG, Seidman CE, Plowden J, Kugler JD 1999 Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest* 104:1567-1573
57. Hirayama-Yamada K, Kamisago M, Akimoto K, Aotsuka H, Nakamura Y, Tomita H, Furutani M, Imamura S, Takao A, Nakazawa M, Matsuoka R 2005 Phenotypes with GATA4 or NKX2.5 mutations in familial atrial septal defect. *Am J Med Genet A* 135:47-52
58. McElhinney DB, Geiger E, Blinder J, Benson DW, Goldmuntz E 2003 NKX2.5 mutations in patients with congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 42:1650-1655
59. Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG 1998 Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science* 281:108-111
60. Alt B, Elsalini OA, Schruppf P, Haufs N, Lawson ND, Schwabe GC, Mundlos S, Gruters A, Krude H, Rohr KB 2006 Arteries define the position of the thyroid gland during its developmental relocalisation. *Development* 133:3797-3804
61. Refetoff S 2003 The syndrome of resistance to thyroid stimulating hormone. *J Chin Med Assoc* 66:441-452
62. Tonacchera M, Di Cosmo C, De Marco G, Agretti P, Banco M, Perri A, Gianetti E, Montanelli L, Vitti P, Pinchera A 2007 Identification of TSH receptor mutations in three families with resistance to TSH. *Clin Endocrinol (Oxf)* 67:712-718
63. Grasberger H, Mimouni-Bloch A, Vantyghem MC, van Vliet G, Abramowicz M, Metzger DL, Abdullatif H, Rydlewski C, Macchia PE, Scherberg NH, van Sande J,

- Mimouni M, Weiss RE, Vassart G, Refetoff S 2005 Autosomal dominant resistance to thyrotropin as a distinct entity in five multigenerational kindreds: clinical characterization and exclusion of candidate loci. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4025–4034
64. Grasberger H, Vaxillaire M, Pannain S, Beck JC, Mimouni-Bloch A, Vatin V, Vassart G, Froguel P, Refetoff S 2005 Identification of a locus for nongoitrous congenital hypothyroidism on chromosome 15q25.3–26.1. *Hum Genet* 118:348–355
65. Dubourg C, Bendavid C, Pasquier L, Henry C, Odent S, David V 2007 Holoprosencephaly. *Orphanet J Rare Dis* 2:8
66. Aggarwal VS, Liao J, Bondarev A, Schimmang T, Lewandoski M, Locker J, Shanske A, Campione M, Morrow BE 2006 Dissection of Tbx1 and Fgf interactions in mouse models of 22q11DS suggests functional redundancy. *Hum Mol Genet* 15:3219–3228
67. Castanet M, Lyonnet S, Bonaiti-Pellie C, Polak M, Czernichow P, Leger J 2000 Familial forms of thyroid dysgenesis among infants with congenital hypothyroidism. *N Engl J Med* 343:441–442
68. Legouis R, Hardelin JP, Levilliers J, Claverie JM, Compain S, Wunderle V, Millasseau P, Le Paslier D, Cohen D, Caterina D, et al. 1991 The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell* 67:423–435
69. Habets PE, Moorman AF, Clout DE, van Roon MA, Lingbeek M, van Lohuizen M, Campione M, Christoffels VM 2002 Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5 inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: implications for cardiac chamber formation. *Genes Dev* 16:1234–1246
70. Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I 2001 Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet* 28:276–280

71. Devos H, Rodd C, Gagne N, Laframboise R, Van Vliet G 1999 A search for the possible molecular mechanisms of thyroid dysgenesis: sex ratios and associated malformations. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2502–2506
72. Perry R, Heinrichs C, Bourdoux P, Khoury K, Szots F, Dussault JH, Vassart G, Van Vliet G 2002 Discordance of monozygotic twins for thyroid dysgenesis: implications for screening and for molecular pathophysiology. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4072–4077
73. Vassart G, Dumont JE 2005 Thyroid dysgenesis: multigenic or epigenetic ... or both? *Endocrinology* 146:5035–5037
74. Maciel RMB. Tiróide: fisiologia e avaliação diagnóstica. In *Endocrinologia*, Saad MJA, Maciel RMB, Mendonça BB (eds), Editora Atheneu, São Paulo, 2007, pp299–330

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), Auxílio à pesquisa 06/54950-6 e Fundação Araucária (Programa de Pesquisa para o SUS, protocolo nº 9348). Os autores agradecem a colaboração dos Drs. Gisah Amaral de Carvalho e Luiz de Lacerda e valiosas discussões com os Drs. Peter Kopp, Samuel Refetoff e Massimo Tonacchera.

Tabela 1. Resumo das diferentes fases do desenvolvimento tiroídiano: aspectos embriológicos, morfológicos e genéticos

Dia Embrionário Camundongo	Dia Embrionário Humano	Morfologia	Genes reguladores		Diferenciação	
			Titf1 Foxe1 Pax8 Hhex	Ffgr2	Tg Nis TPO Tshr	T4
E8	20d	Endoderma indiferenciado	-	-	-	-
E8.5	22d	Primórdio Tiroídiano	+	-	-	-
E9.5	22-26d	Broto Tiroídiano	+	-	-	-
E10.5	26d	Migração	+	-	-	-
E11.5	37d	Desaparecim. Ducto Tiroglosso	+	+	-	-
E12.5	44d	Expansão-Fusão Corpos Ultimobranq.	+	+	-	-
E13.5	48d	Final Migração Início Foliculg.	+	+	-	-
E14.5-15.5 E15.5-16	50d	Lobulação e Foliculogênese Início da Diferenciação	+	+	+	-
E16.5	10-12 sem	Fim da Diferenc. Terminal Organogênese Completa	+	+	+	+

+, Presente; -, Ausente

Tabela 2. Modelos animais de DT

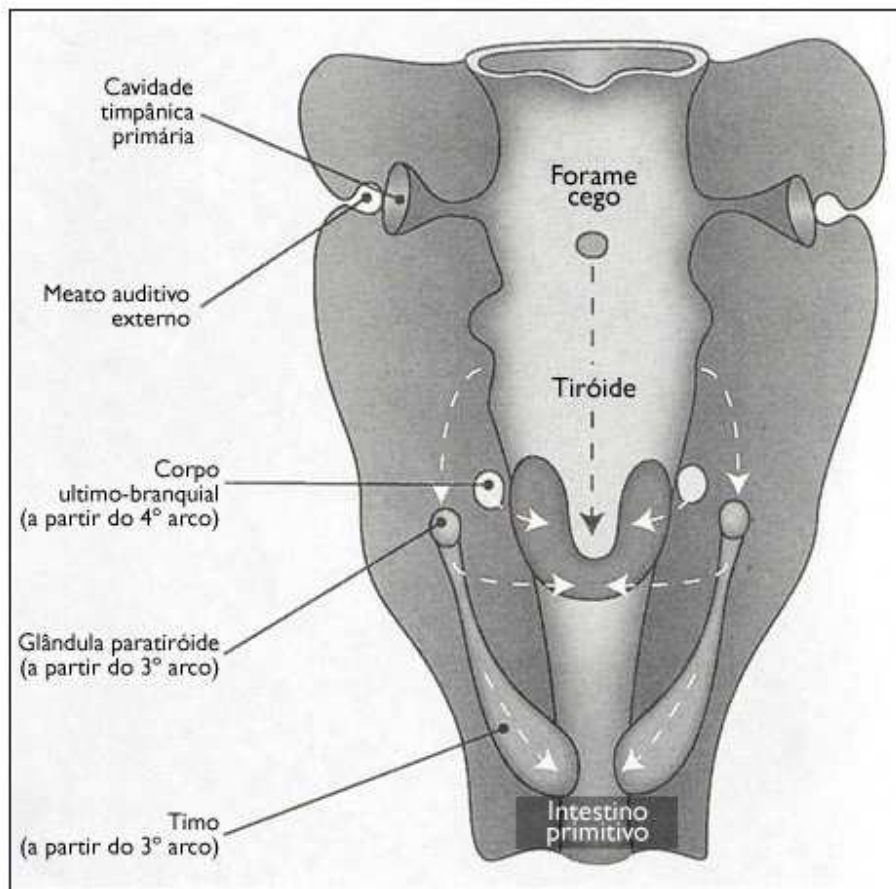
Gene	Função	Fenótipo tiroidiano
Hhex	Fator de transcrição	Agenesia
Titf1	Fator de transcrição	Agenesia
Pax8	Fator de transcrição	Agenesia
Pax3	Fator de transcrição	Hipoplasia
Foxe1	Fator de transcrição	Agenesia ou Ectopia
Tshr	Receptor acoplado à proteína G	Hipoplasia
Fgfr2	Receptor tirosinoquinase	Agenesia
Fgf10	Fator de crescimento	Agenesia
Nkx2.5	Fator de transcrição	Hipoplasia
Hoxa3	Fator de transcrição	Hipoplasia
Hoxa5	Fator de transcrição	Defeito de diferenciação funcional
Eya 1	Fator de transcrição	Hipoplasia
Edn-1	Peptídeo de sinalização	Hipoplasia
Tbx1	Fator de transcrição	Hipoplasia e Hemiagenesia
Shh	Morfogene	Hemiagenesia

Adaptado de De Felice e Di Lauro et al. (ref. 1)

Tabela 3. Mutações descritas no gene *PAX8* em HC

Nº Casos	Alteração Genética	Mutação	Proteína	Morfologia Tiroidiana	Estado Tiroidiano	Ref.
2	<i>Missense</i>	91C>T	R31C	Hipoplasia	HC Eutiroidiano	43
1	<i>Missense</i>	92G>A	R31H	Hipoplasia	HC	44
2	<i>Missense</i>	119A>G	Q40P	Hipoplasia Normal	HC Eutiroidiano	40
7	<i>Missense</i>	143C>T	S48F	Hipoplasia Normal	HC Hipo Subclínico	42
3	<i>Missense</i>	155G>C	R52P	Hipoplasia Normal	HC Eutiroidiano	39, 46
3	<i>Missense</i>	161A>G	S54G	Hipoplasia	HC	45
2	<i>Missense</i>	170G>A	C57Y	Hipoplasia	HC	47
3	<i>Missense</i>	185T>G	L62R	Hipoplasia Cisto Rudimentar	HC Hipo Subclínico	44
3	Deleção	277del	277del	Hipoplasia Normal	HC Hipo Subclínico Eutiroidiano	41
1	<i>Nonsense</i>	322C>T	R108X	Hipoplasia	HC	44

Figura 1. Vista frontal dos órgãos derivados da faringe primitiva



Legenda da Figura

Figura 1. A tiróide forma-se a partir da migração do primórdio tiroidiano, que é derivado do assoalho do intestino primitivo. À medida que migra para baixo, associa-se às células derivadas do corpo último-branquial, provenientes do 4º. arco branquial, que contém as células C, para formar a glândula tiróide madura. O forame cego é uma abertura formada pela invaginação do primórdio tiroidiano que se fecha posteriormente durante o desenvolvimento. As glândulas paratiróides e o timo derivam-se do 3º. arco branquial. A cavidade timpânica e o meato auditivo externo formam-se a partir do 1º. arco branquial (Adaptado de Maciel RMB, ref. 74).

Trabalho 2, submetido à revista Clinical Endocrinology:

**Clinical and Molecular Analysis of Thyroid Hypoplasia:
A Population-based Approach in Southern Brazil**

Helton E. Ramos, Suzana Nesi-França, Valter T. Boldarine, Rosana M. Pereira, Hans Graf,
Luiz de Lacerda, Gisah A. Carvalho and Rui M. B. Maciel

**Clinical and Molecular Analysis of Thyroid Hypoplasia:
A Population-based Approach in Southern Brazil**

Helton E. Ramos, Suzana Nesi-França, Valter T. Boldarine, Rosana M. Pereira, Hans Graf, Luiz de Lacerda, Gisah A. Carvalho and Rui M. B. Maciel

Laboratory of Molecular Endocrinology, Division of Endocrinology, Department of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil (HER, VTB, RMBM); Division of Endocrinology and Metabolism (HER, HG, GAC), and Pediatric Endocrinology Unit (SN-F, LL), Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil; and Neonatal Screening Program-Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (SN-F, RMP), Curitiba, Brazil

Abbreviated Title: Thyroid hypoplasia: clinical and molecular analysis

Corresponding Author: Rui M. B. Maciel, M.D., Ph.D.

Laboratory of Molecular Endocrinology, Federal University of São Paulo

Rua Pedro de Toledo, 781. 12º Andar, São Paulo-SP, Brazil 04039-032

Tel. +55-011-5081-5233 FAX. +55-011-5084-5231

email: rmbmaciel-endo@pesquisa.epm.br

Keywords: Congenital hypothyroidism; Thyroid hypoplasia; Thyroid dysgenesis; PAX8; TSH receptor; NKX2.5

DISCLOSURE STATEMENT: The authors have nothing to disclose

ABSTRACT

Context: Congenital hypothyroidism (CH) is mainly due to developmental abnormalities leading to thyroid dysgenesis (TD). TD encompasses a very distinct morphologic subtypes of disease.

Objective: This study examined and compared the phenotype in TD variants and searched for genetic alteration in sporadic thyroid hypoplasia (TH), the most misdiagnosed form of CH.

Design: This was a longitudinal study over a 14-year period (1990–2004).

Setting: Neonatal screening program for CH.

Patients: Among 2,546,112 neonates screened, 644 children were identified with CH; 453 children were identified with permanent primary CH.

Materials and Methods: A continuous series of 353 children with TD was identified using thyroid function tests (TT₄ and TSH), scintigraphy, and ultrasound as diagnostic tools. Individual phenotypes were analyzed in 253 children with TD. Mutations in the most likely candidates genes were studied in 35 cases of TH.

Results: The overall birth prevalence of CH was 1:3953. Ectopy represented 37% of all cases of permanent primary CH, dyshormonogenesis (28%), agenesis (24%), hypoplasia (10%) and hemigenesis (1%). The lowest screening T₄ levels and the highest TSH levels were in the agenetic group followed by TH. TH group had an improvement in the thyroid function showing less severe phenotype with aging. In the molecular analysis, one patient was identified with a mutation of *PAX8* gene (Arg52Pro); four patients had a heterozygous G>C substitution in position -569; two patients showed Pro52Thr or Asp727Glu polymorphic variants of the *TSH-R* gene; and one patient presented a novel nonsynonymous substitution, Ser98Asn, in the *NKX2-5* gene.

Conclusions: Prevalence of CH was within the previously reported range of 1:3000–4000. Ectopy was the most common etiology. Clinical analysis revealed distinct hormonal patterns in TH subgroup when compared with other variants of TD, with genetic abnormalities identified only in few cases in *TSH-R*, *PAX8* and *NKX2.5* genes.

Introduction

Congenital Hypothyroidism (CH) is the most common inborn endocrine disease, affecting 1 in 3000–4000 newborns (1–4); it is due mainly to developmental abnormalities (80–85% of cases), grouped under the name thyroid dysgenesis (TD), but it can be also caused by dyshormonogenesis (10–15%) and transient hypothyroidism (5%). TD includes 4 variants, ectopy, agenesis or athyreosis, hypoplasia, and hemiagenesis (5). Ectopic thyroid is the most frequent malformation, with thyroid tissue being found most frequently at the base of the tongue. Thyroid agenesis (or true athyreosis) is the second more frequent anomaly and is defined by the absence of any detectable thyroid tissue, with no uptake of radioisotope in the thyroid bed, along the normal path of descent or anywhere in the cervical area. Thyroid hypoplasia (or apparent athyreosis) (TH) is characterized by the presence of a hypoplastic, hypofunctional, bilobed and orthotopic thyroid which takes up radiosotopes rather poorly. Thyroid hemiagenesis is a disorder in which one lobe of the gland fails to develop. TH and thyroid hemiagenesis are considered the rarest TD abnormalities, representing 5–10% of cases in all series (5).

To understand the pathogenesis of these several TD forms, it would be necessary to clearly distinguish its various phenotypes, since their differentiation is difficult, particularly among newborns who present absent or poor uptake on scintigraphy. They are a heterogeneous group of patients and the differential diagnosis includes TH, thyroid agenesis, and thyroid ectopy, but also transient disorders, as the presence of anti-TSH-Receptor (TSH-R) antibodies passed through the placenta from the mother and acute iodine overload (1–3). Difficulties for a correct diagnosis of these several TD forms are due to weaknesses in previous studies, among them: a) the percentage of patients who had scintigraphy either was not reported or was performed in a much smaller proportion of patients (6); b) ultrasound scanning was underutilized (7); c) the etiological category was not very well defined, since some patients with small thyroid gland and poor uptake of the tracer have been assigned with dyshormonogenesis (8); d) the studies were limited by the short duration of follow-up and

small cohort size; e) there are limited data available on patterns of hormonal concentrations for TSH and T4. Among the several TD forms, TH is misdiagnosed and underdetected due to the lack of a systematic evaluation using both scanning and ultrasound. Therefore, a detailed study of the clinical aspects and hormonal profile of patients with TH is needed.

TH seems to result from involution or failure of the thyroid to grow during embryonic life or in the postnatal period and its molecular pathogenesis is still unsolved. Knockout experiments in mice indicates that TH can be caused by defects in transcription factors (Pax3, Pax8, Nkx2.5, Hoxa3, Tbx1, Eya1) or other genes involved in thyroid development (signaling peptides, growth factors, growth factor receptors and Tshr) and either inability to receive TSH signal by posttranslational defects in the TSH receptor (4,9). In humans, the disease is monogenic in a small number of cases, including loss-of-function mutations in *TSH-R*, *PAX8* and *TTF1*; and rarest, defects in genes coding G_sα-subunit and TSHβ-subunit (1-4).

In this study we have initially dissected the individual phenotypes of a cohort of 353 patients with TD to define those 35 affected by well documented TH to particularly search for mutations in the potential candidate genes *PAX8*, *TSH-R* and *NKX2.5*.

Subjects and Methods

Patients

The State of Paraná Neonatal Screening Program, in Brazil, supported and handled with a 100% state coverage by the Ecumenic Foundation for Care of Handicapped, screened 2,546,112 newborns from 1990 to 2004 by TSH measurement on dried blood spots collected on filter paper at 48 h of life from a heel prick (TSH cut-off 10 mU/L, Delphia Perkin-Elmer immunofluorimetric assay). The screening and initial evaluation follow a procedure previously described (10). If the TSH level was higher than 30 mU/L, the neonate was immediately referred for evaluation and treatment in the Pediatric Endocrinology Unit, Federal University of Paraná; if the TSH concentration was between 10–30 mU/L, another sample was requested, and the child was referred if TSH is still higher than 10 mU/L. Within 24 h of a positive screening result, the neonates had a history and a physical examination performed and a blood sample was taken for confirmation of diagnosis [serum TSH and total T4 (TT4)] employing chemoluminescent assays; reference intervals are 6–12 µg/dL for TT4 and 0.3–4 mU/L for TSH. After the confirmation of results, levothyroxine (L-T4) replacement treatment, 10–15 µg/kg/day, was started and L-T4 dosage was adjusted during infancy and childhood according to serum TSH and TT4. When the infants reach 3 years, they follow a protocol to determine if the CH is permanent or transient, consisting of serum thyroid function tests (TSH and TT4), thyroid ¹²³I or ¹³¹I scanning, and thyroid ultrasound after 30 days of L-T4 therapy discontinuation. According to the results, children were divided into five groups: 1) ectopy, 2) agenesis, 3) hypoplasia, 4) hemiagenesis and 5) normal eutopic thyroid gland or goiter. The presence of cardiac congenital malformations was ascertained from chart review and were considered significant only in children older than 2 years.

The female:male proportion, with 95% confidence intervals, was calculated in all etiological categories and compared to theoretical proportion of 0.5 (which is expected in autosomal recessive conditions) using the z statistic. Repeated-measures ANOVAs were performed to determine the patterns of TSH and TT₄ concentrations in all groups. Serum TSH

and TT4 concentrations were normally distributed, and a Bonferroni correction for multiple comparisons was used. Pearson correlations were used to assess the relationship between TSH and TT4 measured at diagnosis and at the time of the protocol to confirm the diagnosis of permanent CH.

The study protocol was approved by both Ethics Committees of University Hospitals of Federal Universities of São Paulo and Paraná. Fifty normal individuals from the same geographic area were used as controls. All parents of minors gave informed consent.

Genotype analysis

For the molecular analysis, we focused on 35 patients with TH (27 females and 8 males) studying candidate genes *PAX-8*, *NKX2.5*, and *TSH-R*. We did not include *NKX2.1* and *FOXE-1* because the phenotype analysis of our patients with TH did not reveal any infant with Bamforth–Lazarus syndrome or choreoathetosis. Other 35 patients with thyroid *in situ* having normal volume were also included. DNA was extracted from whole blood using standard techniques. The entire coding region and promoter of the *PAX8* gene, including exon/intron boundaries, was amplified from genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR) using standard techniques. Individual *TSH-R* exons were amplified and the exon 10 was subdivided in 3 overlapping amplicons. The coding region of the *NKX2.5* gene was studied and each of 2 exons were amplified by a total of 4 PCRs. PCR products were sequenced directly on ABI3100 genetic analyzer.

Fifty healthy normal Brazilian individuals from the same geographic area were used as controls (all primers and PCR conditions are available upon request). Genotyping of all family members, for the R52P mutation on *PAX8* gene, were performed using enzymatic digestion with BstUI.

Results

Clinical findings

In 2,546,112 newborns screened, we identified 644 with confirmed CH, giving an overall birth prevalence of 1 in 3953 live births. From these, 566 are followed in our institution. There were 113 children with transient primary CH on the basis of spontaneous normalization of TSH between screening and diagnosis or no rise in TSH after stopping T4 treatment. In all who had a scan in this group, this showed a thyroid of normal position and shape; some were born to mothers who were being treated with antithyroid drugs for Graves' disease or who had anti-peroxidase antibodies. Of the remaining 453 infants, 353 have already been examined at the age of 3 years to determine the CH type. We have found 133 with thyroid ectopy (37% of cases with permanent primary CH), 100 with dyshormonogenesis (28%), 82 with agenesis (24%), 35 with TH (10%), and 3 with thyroid hemiagenesis (1%) (Table 1). In some cases, scintigraphy showed no isotope uptake, but visualization of thyroid tissue was obtained on ultrasound; this was attributed to cystic degeneration of the thyroid (n=1), hypoplasia (n=6) and possible iodide trapping defect (n=2).

As in other study, the female predominance is significant ($z = 5.12$, $p < 0.001$) only for ectopy and not for TH and agenesis (Table 2) (6).

As in another Brazilian cohort of patients with CH (11), there was a higher than expected prevalence of congenital heart disease, 26 of 353 (7.3%). Furthermore, as in the pediatric population of Paraná (12), this overall increase was largely due to persistent ventricular and atrial septal defects.

Screening TSH values were comparable in infants with TH and agenesis (319 ± 47 mU/L vs 321 ± 28 mU/L; $p = 0.6$), but the mean TSH levels was significantly higher (319 ± 47 mU/L vs 199 ± 16 mU/L; $p \leq 0.05$) when compared with the ectopic group. There was a greater difference between the ectopic and agenetic groups (199 ± 16 mU/L vs 321 ± 28 mU/L; $p \leq 0.001$) (Figure 1A). The percentage of infants with screening TSH levels higher than 250 mU/L was also higher

in agenetic infants (54%) than in infants with TH (37%) and ectopy (24%). As shown in Figure 1B, mean confirmatory neonatal TT4 levels were lower in infants with agenesis when compared with infants with ectopy ($1.39 \pm 0.2 \mu\text{g/dL}$ vs $4.13 \pm 0.3 \mu\text{g/dL}$; $p \leq 0.0001$) and TH ($1.39 \pm 0.2 \mu\text{g/dL}$ vs $2.03 \pm 0.6 \mu\text{g/dL}$; $p=0.6$). In TH ($r=-0.51$, $p \leq 0.005$) and ectopic ($r=-0.44$; $p \leq 0.0001$) groups, there was a significant inverse correlation between TSH and TT4 concentrations at diagnosis. However there was no correlation between TSH and TT4 concentrations in the agenetic group at diagnosis ($r=-0.2$; $p=0.1$).

At the protocol to confirm the diagnosis of permanent CH, the mean TSH concentration in the agenetic group was still the highest and a significant difference was now found not only between the ectopic ($248 \pm 22 \text{ mU/L}$ vs $158 \pm 13 \text{ mU/L}$; $P \leq 0.001$), but also between TH ($248 \pm 22 \text{ mU/L}$ vs $173 \pm 30 \text{ mU/L}$; $P \leq 0.005$) group. Therefore, the pattern of mean TSH level varied greatly among the TH group if compared with the one previously observed at diagnosis; now it was more comparable to that seen in the ectopic group ($173 \pm 20 \text{ mU/L}$ vs $158 \pm 13 \text{ mU/L}$; $p=0.7$), but the difference did not attain statistical significance. The mean TT4 levels were consistently the lowest in the agenetic group at protocol to confirm permanent CH. However, the differences between mean TT4 concentrations now reached significance for the TH group ($1.10 \pm 0.1 \mu\text{g/dL}$ vs $2.36 \pm 0.6 \mu\text{g/dL}$; $p \leq 0.05$), and is still highly significant for the ectopic group ($1.10 \pm 0.1 \mu\text{g/dL}$ vs $2.97 \pm 0.2 \mu\text{g/dL}$; $p \leq 0.0001$). The measured lower TSH levels in TH group was now followed by a marginal significant difference in TT4 levels between TH and ectopy ($2.36 \pm 0.6 \mu\text{g/dL}$ vs $2.97 \pm 0.2 \mu\text{g/dL}$; $p \leq 0.01$).

PAX8 gene

A recently reported heterozygous mutation in exon 3 was found in an 11-yr-old girl with TH (13). She had a neonatal persistent jaundice and an elevated TSH at screening (81 mU/L) and a normal TT4 ($7.3 \mu\text{g/dL}$). Neck ultrasound shown an *in situ* bilobed hypoplastic gland and the scanning had 4% uptake. Thyroid function tests with 1 month-off-therapy for confirmation of CH (at age 3 years) showed a very high TSH (339 mU/L) and a very low TT4 (0.9

µg/dL). The mutation was a G>C substitution at position 155 and changed the second nucleotide of codon 52 (Arg52Pro), and leads to a loss of BstUI restriction site allowing independent confirmation. Genotyping of members of the family showed no mutation but the father's DNA was not available (Figure 2).

A heterozygous G>C substitution in position -569 was observed on the promoter region of 4 patients with TH. A heterozygous A to G change at position +43 (IVS5+43A>G) was found in intron 5 of 6 patients with TH. Another abnormality, a G to C substitution at position +49 (IVS6+49G>C) was observed in intron 6 of 7 patients with TH.

TSH-R gene

No mutation were found in patients with thyroid *in situ* and normal volume. A heterozygous nonsynonymous polymorphism in exon 1 was found in a 6-yr-old girl with TH. The TSH was high at screening (448 mU/L) with a very low TT4 (0.74 µg/dL). Neck ultrasound shown an *in situ* hypoplastic thyroid gland and scanning had a low 1.2% uptake. It was a C>A substitution at position 234 and changed the first nucleotide of codon 52 (Pro52Thr). Another nonsynonymous polymorphism in exon 10 was observed in an 8-yr-old girl with TH. It was C>G substitution at position 2181 and changed the third nucleotide of codon 727 (Asp727Glu). She had history of obstipation, large posterior fontanelle, hypoactivity and umbilical hernia. The TSH at neonatal screening (234 mU/L) and an undetectable TT4 indicated a severe hypothyroidism. The confirmatory TSH was 758 mU/L. Neck ultrasound showed two paratracheal hypoechogenic structure of 6 mm in transverse diameter, compatible with a very hypoplastic gland. Scanning demonstrated no functional thyroid tissue.

NKX2.5 gene

A novel heterozygous nonsynonymous polymorphism was found in one patient with TH. It was located in exon 1, a G>A substitution in position 293 (Ser98Asn). The patient is now a

13-yr-old girl who, at 43 days-of-life, presented a confirmatory TSH of 38 mU/L and T4 of 5.8 µg/dL. Under the protocol for CH confirmation, she was tested at age 3 years, TSH was 58.0 mU and T4 9.1 µg/dL. This polymorphic variant was found in 6/50 controls. Another two silent mutations were found, not previously described,: C87A (Ala29Ala) in 1 patient with TH and G541A (Gln181Gln) in other 3 patients with TH.

Discussion

TD is a trait showing a rather broad spectrum in which several phenotypes of the same disease can be identified and large samples are needed in order to find its genetic mechanisms. In this view, epidemiological and population-based studies are relevant because they can promote and orient future molecular studies. We report a large number of TD cases ascertained by thyroid scintigraphy and ultrasound in a long observational study. This report represents analysis of 78% of children diagnosed with CH in the State of Paraná, Brazil during that time period, thus avoiding referral bias. In many series, the percentage of patients who had combined scintigraphy and neck ultrasound was not reported or was performed in a much smaller proportion of subjects (6,13–16).

Estimates of prevalence of CH in countries with screening programs are in the range of 1:3000–4000. Our data showed a prevalence of CH of 1:3953, which is within the reported range; TD was the most common etiology. The proportion of dyshormonogenesis in our population was higher (17,18) or lower (16) than previous reports, suggesting a different genetic background and lack of ultrasound or scintigraphy (13) for investigation.

Furthermore, some studies were based on a screening strategy using TT4 as the primary test, particularly the old series (19,20). In our population, TT4 was normal, mainly in selected cases of ectopy and dyshormonogenesis (not shown), confirming that the proportion of patients with specific etiologies may differ substantially depending on the screening technique. As in previous studies, a significant female predominance was found only for ectopy (6,9). This is consistent with the theory that suggests that the molecular mechanisms resulting in defective thyroid migration may be “modulated by the genetic make-up of the embryo and/or the hormonal milieu of the fetus” (6).

In general, where the etiology of CH was determined, those with agenesis had the most severe outcome (15,21). As in this report, most of these studies found the lowest screening TT4 levels and highest TSH levels in the agenetic group (15,22). However, the collection and interpretation of the data available on patterns of hormonal concentrations for TT4 and TSH in

children with different etiologies of CH need to be scrutinized. A classification based only on morphologic criteria is not entirely satisfactory because of the fact that distinct molecular defects may generate a similar phenotype. This longitudinal study of 353 children with TD revealed distinct hormonal patterns in the subgroups.

An interesting finding in our study was the significant decrease in the severity of hypothyroidism in children with TH when we compare TT4 and TSH levels on the time of screening versus the results obtained by time of confirmation of CH, when the infants are 3-years-old (Figure 1C-D). The regulation of the growth and function of the thyroid by the hypothalamic-pituitary axis may change after birth, and this would explain the gain of functional capacity of the thyroid tissue throughout the first years of life seen in patients with TH. In the developing human thyroid, many genes are connected in a network of reciprocal regulatory interaction with known diversity in their temporal expression (4,5). Other factors like epigenetic modifications, variation in the expression or modulation of relevant genes in the surrounding parenchyma and developing blood vessels that supply the thyroid, can dictate differences in thyroid hormone production and gland growth control after birth (23). Another explanation is the presence of only minor functional disorders, such as partial TSH resistance or transient CH (24). Also, the role of changes in the environmental factors can not be excluded (25,26).

Recently, a study tested a new protocol for rhTSH in the etiological diagnosis of CH in pediatric patients during L-T4 replacement and found transient CH in two patients with TH who had normal stimulation by rhTSH and definitely recovered thyroid function after stopping L-T4 replacement, indicating that their small thyroid volume was the consequence of the early and prolonged replacement therapy (27). Thus, closer follow-up of these patients may become necessary at older ages to prevent unnecessary prolongation of replacement treatment. The treatment and follow-up schedules for TD need to consider the unique hormonal patterns and different responses to therapy in each different etiological categories.

TH can be the consequence of specific developmental defects caused by mutations in transcription factors that govern thyroid ontogeny or, alternatively, in the signaling cascade that

promotes growth and differentiation on thyroid follicular cells (4,5). However, information about the real frequency of these defective alleles in the population remains elusive. As an attempt to fill this gap, we have chosen to use a population-based approach.

In this study, we have analyzed the most likely candidate genes to play important roles in CH with TH, *TSH-R* and *PAX8* (1-5). We found a recently reported mutation in *PAX8* (Arg52Pro) localized in exon 3 of the paired domain, whose functional DNA binding analysis resulted in loss of binding to the thyroglobulin promoter element (13). Indeed, mutations on this site might affect folding and conformation of C-terminal regions of *PAX8*, including regions known to be crucial for transactivation activity (1,4). In contrast with this previously reported case, where the index-case is a boy with unsuspected neonatal screening for CH presenting non-autoimmune, early-onset hypothyroidism dominantly inherited, our patient was not missed in the newborn screening for CH and had a severe hypothyroidism when retested for confirmation for permanent CH (13). Therefore, this variability found so far in the described phenotype, from severe hypothyroidism to euthyroidism, even in individuals with the same mutation, indicates incomplete penetrance, modulation by interacting genes or difference in genetic background.

As in our study, only a few *PAX8* mutations have been previously found in a large panel of patients, thus suggesting this is an infrequent event (1-5). So, it is questionable if the search for *PAX8* mutations should be extended to patients with early-onset hypothyroidism who were negative in CH screening as suggested before (13). We did not perform any analysis on the others modifications found in the promoter or intronic regions.

In our screening for germline inactivating mutation in the *TSH-R* gene, in a group of apparently athyreotic patients without a family history, we observed no significant variation. *TSH-R* mutations have been previously identified in familiar groups of CH, thus the patient's selection may have played an important role because we analyzed patients selected from an entire population, mostly sporadic cases. The C → A polymorphism leading to a Pro → Thr variation in codon 52 was previously detected in other study, in which was also found in normal subjects in a frequency of 0.062 (26). No anomaly was found in the remaining patients. This

might imply that other genes involved in the TSH-TSH-R-GS α cascade could be affected or posttranslational defects modulating TSH binding and affinity as recently suggested (9). TSH is not required for development and migration of the thyroid anlage, but is essential for thyroid growth and function; thus, TSH deficiency or insensitivity results in a hypoplastic and hypofunctional but normally located thyroid gland. *TSH-R* germline mutations may account for some cases of apparent athyreosis and should be suspected especially if plasma thyroglobulin levels are normal (9).

Mutations account for a small number of cases with TH when searched in the coding region of known candidate genes. Therefore, other genes that are yet unknown, somatic mutations, epigenetic events, polygenic susceptibility and an entire complex genetic-environmental network could explain some of the remaining cases (27).

In conclusion, this study offers a contribution to the understanding of prevalence, outcome and genetic alteration in sporadic TH. Clinical analysis of TH revealed distinct hormonal patterns in this subgroup when compared with other causes of TD. Conversely, the genetic abnormalities identified in the *TSH-R*, *PAX8* and *NKX2.5* are not enough to clarify the pathophysiology and the molecular mechanisms underlying defects in the majority of cases of TH. A detailed description of phenotype, as well changes in the hormonal and clinical patterns with aging, might be essential to target the correct genetic and mechanism implicated, and useful to predict severity and permanence. The identification of additional genes or molecular events controlling early postnatal thyroid function would be helpful. Tools like genomewide screening can be an powerfull strategy.

References

1. Kopp, P. (2002) Perspective: genetic defects in the etiology of congenital hypothyroidism. *Endocrinology*, **143**, 2019–2024.
2. Park, S.M. & Chatterjee, V.K. (2005) Genetics of congenital hypothyroidism. *J Med Genet*, **42**, 379–389.
3. Gruters, A., Krude, H. & Biebermann, H. (2004) Molecular genetic defects in congenital hypothyroidism. *Eur J Endocrinol*, **151**, Suppl 3: U39–44
4. De Felice, M. & Di Lauro, R. (2004) Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr Rev*, **25**, 722–746.
5. Deladoey, J., Vassart, G. & Van Vliet, G. (2007) Possible Non–Mendelian Mechanisms of Thyroid Dysgenesis. *Endocr Dev*, **10**, 29–42.
6. Devos, H., Rodd, C., Gagne, N., Laframboise, R. & Van Vliet, G. (1999) A search for the possible molecular mechanisms of thyroid dysgenesis: sex ratios and associated malformations. *J Clin Endocrinol Metab*, **84**, 2502–2506.
7. Perry, R.J., Maroo, S., Maclennan, A.C., Jones, J.H. & Donaldson, M.D.C. (2006) Combined ultrasound and isotope scanning is more informative in the diagnosis of congenital hypothyroidism than single scanning. *Arch Dis Child*, **91**, 972–976.
8. Gruters, A., Finke, R., Krude, H., Meinhold, H. (1994) Etiological grouping of permanent congenital hypothyroidism with a thyroid gland in situ. *Horm Res*, **41**, 3–9.
9. Gagne, N., Parma, J., Deal, C., Vassart, G. & Van Vliet, G. (1998) Apparent congenital athyreosis contrasting with normal plasma thyroglobulin levels and associated with inactivating mutations in the thyrotropin receptor gene: are athyreosis and ectopic thyroid distinct entities? *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 1771–1775.
10. Dubuis, J.M., Glorieux, J., Richer, F., Deal, C.L., Dussault, J.H. & Van Vliet, G. (1996) Outcome of severe congenital hypothyroidism: closing the developmental gap with early high dose levothyroxine treatment. *J Clin Endocrinol Metab*, **81**, 222–227.

11. Kreisner, E., Neto, E.C. & Gross, J.L. (2005) High prevalence of extrathyroid malformations in a cohort of Brazilian patients with permanent primary congenital hypothyroidism. *Thyroid*, **15**, 165–169.
12. Miyague, N.I., Cardoso, S.M., Meyer, F., Ultramari, F.T., Araujo, F.H., Rozkowisk, I. & Toschi, A.P. (2003) Epidemiological study of congenital heart defects in children and adolescents. Analysis of 4,538 cases. *Arq Bras Cardiol*, **80**, 269–278.
13. Al Taji, E., Biebermann, H., Limanova, Z., Hnikova, O., Zikmund, J., Dame, C., Gruters, A., Lebl, J. & Krude, H. (2007) Screening for mutations in transcription factors in a Czech cohort of 170 patients with congenital and early-onset hypothyroidism: identification of a novel PAX8 mutation in dominantly inherited early-onset non-autoimmune hypothyroidism. *Eur J Endocrinol*, **156**, 521–529.
14. Hanukoglu, A., Perlman, K., Shamis, I., Brnjac, L., Rovet, J. & Daneman, D. 2001 Relationship of etiology to treatment in congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 186–191.
15. Castanet, M., Polak, M., Bonaiti-Pellie, C., Lyonnet, S., Czernichow, P. & Leger, J. (2001) Nineteen years of national screening for congenital hypothyroidism: familial cases with thyroid dysgenesis suggest the involvement of genetic factors. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 2009–2014.
16. Olivieri, A., Stazi, M.A., Mastroiacovo, P., Fazzini, C., Medda, E., Spagnolo, A., De Angelis, S., Grandolfo, M.E., Taruscio, D., Cordeddu, V. & Sorcini, M. (2002) A population-based study on the frequency of additional congenital malformations in infants with congenital hypothyroidism: data from the Italian Registry for Congenital Hypothyroidism (1991–1998). *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 557–562.
17. Chao, T., Wang, J.R. & Hwang, B. (1997) Congenital hypothyroidism and concomitant anomalies. *J Pediatr Endocrinol Metab*, **10**, 217–221.
18. Majeed-Saidan, M.A., Joyce, B., Khan, M. & Hamam, H.D. (1993) Congenital hypothyroidism: the Riyadh Military Hospital experience. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **38**, 191–195.

19. Roberts, H.E., Moore, C.A., Fernhoff, P.M., Brown, A.L. & Khoury, M.J. (1997) Population study of congenital hypothyroidism and associated birth defects, Atlanta, 1979–1992. *Am J Med Genet*, **71**, 29–32.
20. Siebner, R., Merlob, P., Kaiserman, I. & Sack, J. (1992) Congenital anomalies concomitant with persistent primary congenital hypothyroidism. *Am J Med Genet*, **44**, 57–60.
21. Rovet, J.F. (1999) Long-term neuropsychological sequelae of early-treated congenital hypothyroidism: effects in adolescence. *Acta Paediatr*, **Suppl 88**, 88–95.
22. MacMillan, D.R. & Mabry, C.C. (1995) Differences in screening and confirmatory thyroid profiles in congenital hypothyroid subtypes: implications for missed cases. *J Perinatol*, **15**, 126–130.
23. Nakamizo, M., Toyabe, S., Asami, T. & Akazawa, K. (2005) Seasonality in the incidence of congenital hypothyroidism in Japan. *J Paediatric Child Health*, **41**, 390–391.
24. Deladoey, J., Belanger, N. & Van Vliet, G. (2007) Random Variability in Congenital Hypothyroidism from Thyroid Dysgenesis over 16 years in Quebec. *J Clin Endocrinol Metab*, **92**, 3158–3161.
25. Fugazzola, L., Persani, L., Vannucchi, G., Carletto, M., Mannavola, D., Vigone, M.C., Cortinovis, F., Beccaria, L., Longari, V., Weber, G. & Beck-Peccoz, P. (2007) Thyroid scintigraphy and perchlorate test after recombinant human TSH: a new tool for the differential diagnosis of congenital hypothyroidism during infancy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **34**, 1498–1503.
26. Simanainen, J., Kinch, A., Westermark, K., Winsa, B., Bengtsson, M., Schuppert, F., Westermark, B., Heldin, N.E. (1999) Analysis of mutations in exon 1 of the human thyrotropin receptor gene: high frequency of the D36H and P52T polymorphic variants. *Thyroid*, **9**, 7–11.
27. Vassart, G., Dumont, J.E. (2005) Thyroid dysgenesis: multigenic or epigenetic ... or both? *Endocrinology*, **146**, 5035–5037.

Acknowledgements

This work was supported by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP), grant 06/54950-6 and by Fundação Araucária, grant Programa de Pesquisa para o SUS – protocol number 9348. The authors are grateful to Janete M. Cerutti and Rosana Tamanaha for helpful discussions, to Teresa Kasamatsu, Ilda Kunii and Mariangela Reis for their excellent technical assistance, to Bonald Cavalcante for help with DNA extraction, to Cleber P. Camacho for statistical analysis, to Cleo O. Mesa for ultrasound in some patients and to Angela Faria, Gianna Cussatis, Marlete Ribeiro, Neusa Luz and Elisabete Coelho for their secretarial support. We appreciate the cooperation of all patients, their families, and endocrinologists involved in their care.

Table 1. Etiology distribution of permanent primary CH

Etiology	Total (%)
Ectopy	133 (37)
Dyshormonogenesis	100 (28)
Agensis	82 (24)
Hypoplasia	35 (10)
Hemiagenesis	3 (1)
Total	353

CH=congenital hypothyroidism

Table 2. Etiology and sex distribution of DT

Etiology	Total	<u>Sex distribution</u>		Proportion of girls (95% CI)
		Female	Male	
Ectopy	133	96	37	0.72 (0.64–0.81)*
Agenesis	82	52	30	0.63 (0.52–0.73)
Hypoplasia	35	26	9	0.74 (0.59–0.88)
Hemiagenesis	3	2	1	0.66 (0.13–1.20)

* Different from 0.5 (z = 5.12; P < 0.001)

Figure 1

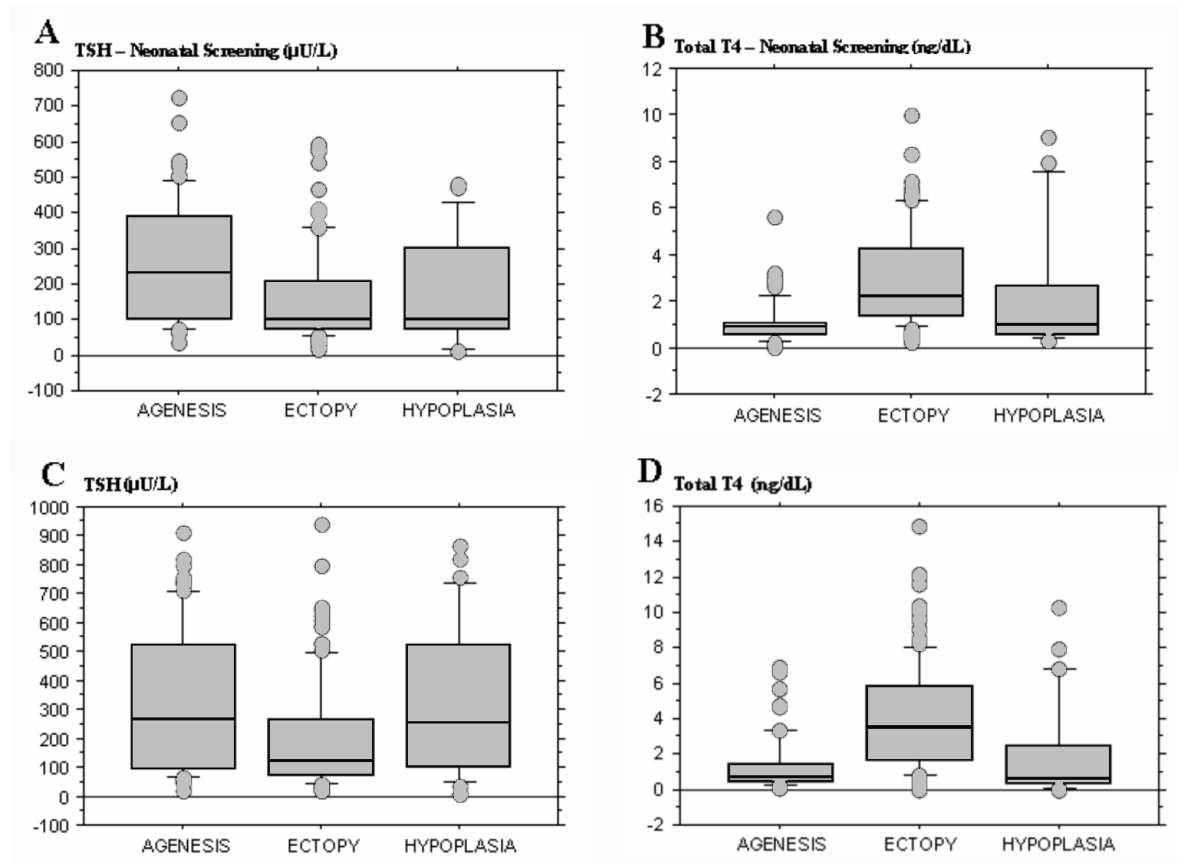


Figure 2.

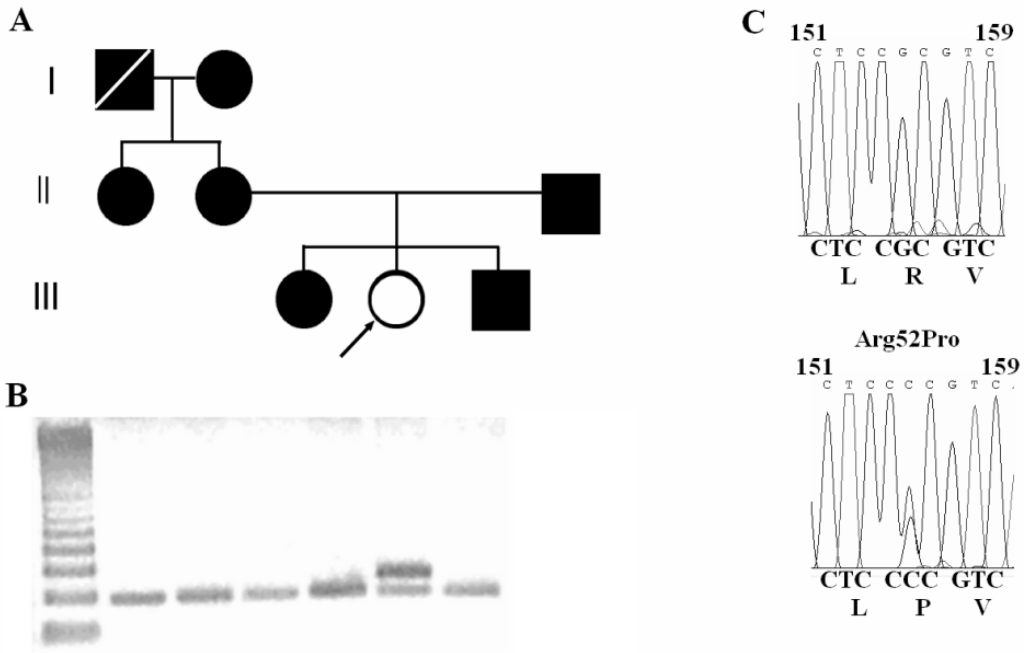


FIGURE LEGENDS

Figure 1.

- A. Mean TSH levels on screening in infants with hypoplasia, agenesis and ectopy
- B. Mean confirmatory neonatal TT₄ levels in infants with hypoplasia, agenesis and ectopy
- C. Mean TSH levels in infants with hypoplasia, agenesis and ectopy on the confirmation protocol for CH
- D. Mean TT₄ levels in infants with hypoplasia, agenesis and ectopy on the confirmation protocol for CH

Figure 2.

- A. Pedigree
- B. Results of genotyping of family members for the mutation shown in C. A 259-bp fragment, amplified by PCR and containing sequences of WT exon 3, produces two bands, 199 bp and 60bp, when digested with BstUI (*latter band not shown*), whereas the mutant allele remains intact. This occurs only in the heterozygous propositus
- C. Electropherograms showing the mutation found in exon 3 of PAX8 in the propositus (*bottom tracing*) and the corresponding normal sequence (*top tracing*)

Trabalho 3, submetido ao Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism:

**NKX2.5 MISSENSE MUTATIONS ARE ASSOCIATED WITH THYROID ECTOPY: A STUDY OF 157
PATIENTS WITH THYROID DYSGENESIS**

Helton E. Ramos, Valter T. Boldarine, Suzana Nesi-França, Cleber P. Camacho,
Gustavo S. Guimarães, Magnus R. Dias da Silva, Hans Graf, Luiz de Lacerda, Gisah
A. Carvalho, and Rui M. B. Maciel

NKX2.5 MISSENSE MUTATIONS ARE ASSOCIATED WITH THYROID ECTOPY: A STUDY OF 157 PATIENTS WITH THYROID DYSGENESIS

Helton E. Ramos, Valter T. Boldarine, Suzana Nesi-França, Cleber P. Camacho, Gustavo S. Guimarães, Magnus R. Dias da Silva, Hans Graf, Luiz de Lacerda, Gisah A. Carvalho, and Rui M. B. Maciel

Laboratory of Molecular Endocrinology, Division of Endocrinology, Department of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil (HER, VTB, CPC, GSG, MRDS, RMBM); Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine (HER, HG, GAC) and Endocrine Pediatric Unit, Department of Pediatrics (SN-F, LL), Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil; and Neonatal Screening Program-Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (SN-F), Curitiba, Brazil

Address correspondence to: Rui M. B. Maciel, M.D., Ph.D.

Laboratory of Molecular Endocrinology, Division of Endocrinology

Department of Medicine, Federal University of São Paulo

Rua Pedro de Toledo, 781-12º Andar São Paulo-SP, Brazil 04039-032

Tel. +55-011-5081-5233 FAX. +55-011-5084-5231

email: rmbmaciel-endo@pesquisa.epm.br

Abbreviated Title: NKX2.5 mutations and thyroid ectopy

Keywords: Thyroid dysgenesis, NKX2.5, Congenital hypothyroidism, Thyroid ectopy, Congenital heart disease

Abbreviations: CH, Congenital hypothyroidism; TD, Thyroid dysgenesis; CHD, Congenital heart disease

ABSTRACT

Context: Congenital hypothyroidism (CH) is due to thyroid dysgenesis (TD) in 80–85% of the cases. Initially, the homeobox transcription factor NKX2.5 was thought to be only required for the organogenesis of the heart tube; however, *Nkx2.5*^{-/-} embryos exhibited a smaller outgrowing thyroid bud. Indeed, several loss of function mutations in NKX2.5 have been described in patients with Congenital Heart Disease (CHD), and recently, an Italian study has identified three mutations in patients with TD.

Objectives: To address if genetic abnormalities of *NKX2.5* could be associated with patients presenting both CHD and TD, we have performed a mutational screening in 17 patients with both cardiac and thyroidal phenotype, in 140 patients presenting isolated TD, and then, compared with the results with 50 normal controls.

Results: The screening revealed four novel missense mutations only in patients with thyroid ectopy. All of them are predicted to result in codon change in conserved domain (Asp16Glu, Ala80Gly, Asp105Glu, Ala119Ser, and Leu245Ile). *NKX2.5* mutations were not found in patients having both TD and CHD.

Conclusion: Novel *NKX2.5* mutations are associated with one particular TD form, ectopy, a finding that reinforces the role for *NKX2.5* in thyroid embryogenesis. We also confirmed that the mutation rate in *NKX2.5* is low in patients with TD (3%), even in a large phenotype-focused study. Parallel to the heart development, *NKX2.5* might have an essential role in thyroid morphogenesis and is likely to be a component of the genetic circuit controlling thyroidal cell specification and migration.

Introduction

Congenital hypothyroidism (CH) occurs in 1:3,500–1:4,000 newborns (1). In 80–85% of the cases, CH is due to thyroid dysgenesis (TD), which are developmental abnormalities of the thyroid gland including thyroid ectopy, thyroid agenesis or athyreosis (the complete absence of thyroid tissue), thyroid hypoplasia (the decrease of thyroid size), and thyroid hemiagenesis (2). In contrast to thyroid dysmorphogenesis, the elucidation of the underlying etiology of most cases of TD is less understood. Several specific transcription factors, in view of their important role in thyroid organogenesis and thyroid-specific gene expression, would be strong candidate genes for the etiology of TD; thus, the thyroid transcription factor 1 (*TTF-1*, also known as *NKX2.1*, or T/ebp), forkhead box E1 (*FOXE1*, also known as *TTF-2*) and the paired homeodomain factor *PAX-8* have been described as causes of human TD (1). However, abnormalities in these genes have been found in only a small proportion of patients with TD (1, 2).

NKX2.5 is a vertebrate member of the NK-2 class of homeobox genes, which appears to function during the early period of organogenesis in the developing embryo. Murine *Nkx2.5* is expressed in early heart progenitor cells, as well as in thyroid, tongue, stomach and spleen (3–5). The *NKX2.5* transcription factor is known to be essential for normal heart morphogenesis, myogenesis and function (6). Several loss of function mutations in *NKX2.5* (OMIM 600584) have been described in patients with Congenital Heart Disease (CHD) (7–10).

CHD has a higher frequency in children with CH than in the general population (11, 12). As soon as *NKX2.5* was considered a possible candidate gene involved in the pathogenesis of human TD, a mutational screening was conducted in 241 patients with TD in Italy, allowing identification of 3 mutations in 4 cases (5).

The function of *NKX2.5* in thyroid morphogenesis and differentiation is unknown. In mouse, *Nkx2.5* expression has been recently demonstrated in precursors of thyroidal

cells in the pharyngeal floor at embryonic day 8.5 (E8.5), a period coincident with the appearance of *Titf-1*, *Pax-8* and *Foxe1*, but disappears around E12.5 (4). Therefore, once *Nkx2.5* mRNA is present in the thyroid primordium at an early stage of development, it might be required in normal thyroid morphogenesis. *Nkx2.5*^{-/-} embryos exhibited a smaller outgrowing bud of endodermal cells, indicating that *Nkx2.5* is required as component of the genetic control of thyroid development (5).

To address the question if genetic abnormalities of *NKX2.5* could play an important role in patients presenting both CHD and TD, we performed a mutational screening in a Brazilian cohort of 17 patients with both cardiac and thyroidal phenotype and in 140 presenting isolated TD, and then, compared with 50 normal controls. Our results indicate that no *NKX2.5* mutations were found in with patients having both CHD and TD. Furthermore, we observed that *NKX2.5* mutations are closely associated with one particular TD form, thyroid ectopy, a finding that could imply a possible role for *NKX2.5* in the induction of the primordial thyroid migration.

Materials and Methods

Patients

From 1990 to 2004 we screened 2,546,112 newborns in the neonatal thyroid screening program of the State of Paraná, Brazil by dry blood spot TSH measurement collected after 48 h of life from a heel prick (TSH cut-off 10 mU/L, Delphia Perkin-Elmer immunofluorimetric assay) and found 644 with a confirmed diagnosis of CH, from which 566 are followed in our institution. Among them, 353 have been already examined at the age of 2–3 years to confirm the diagnosis of permanent CH, following a protocol consisting of thyroid function tests (serum TSH, normal reference values between 0.3 and 4 mU/L and total T4, normal reference values between 4,5 and 12 µg/dL, by chemiluminescence), thyroid ¹²³I or ¹³¹I scanning, and thyroid ultra-sound 30 days after the withdrawal of L-thyroxine (L-T4). Among them, 253 patients had the diagnosis of TD, including ectopy (n=131), agenesis (n=83), hypoplasia (n=35), or hemiagenesis (n=4) and 100 patients had the diagnosis of dyshormonogenesis.

From the 253 infants with TD, we performed cardiac evaluation in all, and found 17 with simultaneous TD and CHD. For the *NKX2.5* genotypic analysis we first included these 17 infants with TD and CHD (7 with ectopy, 5 with hypoplasia, 2 with agenesis and 3 with hemiagenesis) plus 140 infants with TD without CHD (60 with ectopy, 50 with agenesis and 30 with hypoplasia). Fifty normal individuals from the same geographic area were used as controls.

The cardiac phenotype was evaluated by history, review of medical records and physical examination; if necessary, 12-lead electrocardiogram (EKG) and 2 dimension transthoracic echocardiography were performed. Family history of CHD and thyroid disease was investigated by chart report (i.e., clinical testing of parents was not performed for the purposes of this study). Medical records of patients with an *NKX2.5* mutation were reviewed to determine whether any non-cardiac congenital malformations or other recognized genetic syndromes were present. Clinical studies were performed without

knowledge of genotype. Written informed consent was obtained from the parents of all participants in accordance with protocols approved by the Institutional Review Board for Human Research at the Federal University of Paraná and at the Federal University of São Paulo.

Genotype analysis

Deoxyribonucleic acid was extracted from whole blood using standard techniques. The coding region of the *NKX2.5* gene, including exon/intron boundaries, was amplified from genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR). Each of 2 exons were amplified by a total of 4 PCRs with the following two pair of primers derived from the flanking introns: 1AF 5'-CGGCACCATGCAGGGAAG-3', 1AR 5'-GGGTCCTTGGCTGGGTCGG-3', 1BF 5'-CCTAAACCTGGAACAGCAGC-3' and 1BR 5'-TCCTGGCCCTGAGTTTCTTG-3' for exon 1; 2AF 5'-GCGCTCCGTAGGTCAAGC-3', 2AR 5'-TAGGGATTGAGGCCACG-3', 2BF 5'-CAGACTCTGGAGCTGGTGG-3' and 2BR 5'-CCCGAGAGTCAGGGA-3' for exon 2. 100 ng of genomic DNA was amplified in a 25- μ L volume containing: 40 ng of each oligonucleotide primers; 200 μ mol/L each of deoxyadenosine triphosphate, and deoxythymidine triphosphate; 5 μ L of Q solution (QIAGEN Inc.,Valencia, California, USA) and Taq polymerase. All reactions started with 2 minutes at 95C followed by 35 cycles of 45 seconds at 95C, 30 seconds at 59C or 60C, and 45 seconds at 72C and finished with a 10-minute extension period at 72C. DMSO (0.2 mL/20- μ L reaction) was added to standard reagents for the first reaction of exon 2. Enhancer solution (PCR enhancer system, Gibco BRL) was added to standard reagents at 1X concentration for the second reaction of exon 2. PCR products were purified with Qiaquick PCR purification kit (QIAGEN) and sequenced using the ABI PRISM Dye Terminator cycle sequencing Ready Reaction kit (PE Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Sequences were analyzed with Sequence Navigator Software (PE Applied Biosystems). Bidirectional sequencing was performed by an automated cycle sequencer (ABI3100 genetic analyzer).

Sequence alterations were examined in context of the open reading frame to determine whether the alteration would change the corresponding amino acid.

In silico multivariate analysis of protein polymorphism (MAPP) of NKX2.5

The functional impairment of the mutated NKX2.5 proteins were quantified using MAPP test (13). This method uses two principles. First, the difference in physicochemical properties between the “wild-type” amino acid and the missense variant are the root cause of functional impairment, and that evolutionary variation among orthologs in the affected position is the limit range of the physicochemical properties that are tolerated at that position. MAPP test has been validated for several other proteins (β hemoglobin, p53, RET) since it quantifies the physicochemical changes of a multiple sequence alignment of protein orthologs. In addition, it calculates the deviation of candidate amino acid replacements from this variation, in which a change getting high scores indicates worse functional damage (14).

To estimate the impact of an amino acid substitution on NKX2.5 protein function we have used 6 physicochemical property scales, namely hydropathy, polarity, charge, volume, and free energy in alpha and beta-strand conformation (14). We chose a threshold of $P=0.01$ to reject the null hypothesis and declare an amino acid incompatible, that is, substitutions for which $P < 0.01$ were predicted to be deleterious.

Statistical Analysis

We used t test to estimate the differences in the frequency of CHD in our cohort and the general population (15) and between each subgroup of TD and the dishormonogenetic group ($n=100$). We built a two-way contingency table comparing the group of positive heart disease with each type of TD, thus we tested for dependence between each categorization and patients with dishormonogenesis. The association of CHD in each subgroup and *NKX2.5* mutation was analyzed by χ^2 (Fisher's Exact Test).

Results

Clinical observations

In our entire population of 253 infants with TD, ectopy is the most common form (131 infants; 53%), followed by agenesis (83 infants; 32%), hypoplasia (35 infants; 14%) and hemiagenesis (4 infants; 1%). Additionally, we found a high prevalence of CHD in patients with TD (17/253; 6,7%).

Two-way contingency table reveals that patients with hypoplasia and hemiagenesis tended to present CHD ($P=0.05$ and $P=0.0002$, respectively), while patients with ectopy and agenesis do not present an association with CHD.

Novel mutations in the *NKX2.5* gene

Three infants with thyroid ectopy presenting four novel *NKX2.5* mutations were found; in addition, we have also identified another patient with ectopy harboring a mutation already described (5) (Table 1, Figure 1). Therefore, all mutations described in *NKX2.5* are in patients with ectopy, which reveals an association between ectopy and *NKX2.5* mutations ($P=0.03$). Furthermore, none affected individuals harboring *NKX2.5* mutations presented CHD.

Patient 1 is a 8-yr-old boy with an ectopic thyroid gland and benign systolic ejection murmur, but without alteration in the echocardiogram, who harbors an heterozygous missense mutation in exon 1, C48A (Asp16Glu); TSH value in this patient at screening was 133 mU/L and serum TSH and T4 at 23 days of life were, respectively, 33 mU/L and 6.6 µg/dL. Patient 2 is a 10-yr-old girl with ectopic thyroid gland who presented 2 novel missense mutations: C239G (Ala80Gly) and C315G (Asp105Glu); at 36 days of life a confirmatory serum TSH value of 165 mU/L and a T4 of 5.0 µg/dL were obtained; when she was 3 years-old, she underwent the protocol for confirmation of permanent CH which showed a TSH value of 83 mU/L and a T4 value of 6.9 µg/dL. Patient 3 is a 11-yr-old girl with isolated ectopic thyroid gland who presented a mutation in exon

2, C733A (Leu245Ile); she presented at 25 days of life TSH and T4 values of, respectively, 28 mU/L and 2.2 µg/dL. Finally, another mutation already published was found in a subject with ectopy (G355T, Ala119Ser), localized a few residues upstream to the beginning of the homeodomain (5). Patient 4 is a 6-yr-old girl who presented screening TSH and T4 values, at 3 days of life, of respectively, 79 mU/L and 3.2 µg/dL; later, on the confirmation protocol, TSH and T4 values were, respectively, 68 mU/L and 1 µg/dL.

We do not find any *NKX2.5* mutation in patients with both TD and CHD (Table 2). Table 3 shows several polymorphisms found. A novel non-synonymous polymorphism was found in the exon 1 of 2 patients with isolated TD. It was a G>A substitution in position 293 (Ser98Asn) in one girl with thyroid hypoplasia and additionally in the patient 4. Other 3 not previously described silent mutations were found: C87A (Ala29Ala) in 1 patient with both ectopy and CHD and in 4 patients without CHD (1 with agenesis, 1 with ectopy and 1 with hypoplasia); C225A (Arg75Arg) in 2 patients with isolated ectopic gland; and G541A (Gln181Gln) in 5 patients with isolated TD (2 with ectopy and 3 with hypoplasia). In addition, 2 already known polymorphisms were also found, A63G polymorphism (Glu21Glu), observed in 4/17 TD patients with CHD (24%) and in 22/140 TD patients without CHD (17%); the second, G594A (Gln198Gln), was identified in 1 patient with isolated thyroid ectopy.

Predicting mutational tolerance of *NKX2.5* variants by MAPP

Variants Asp16Glu of patient 1, Asp105Glu of patient 2 (one of the mutated alleles), Leu245Ile of patient 3, and Ala119Ser of patient 4 presented high MAPP scores, indicating greater physicochemical dissimilarity from the observed evolutionary variation in the alignment and suggesting a greater functional impairment of their respective proteins (Table 4, Figure 2). On the other hand, variant Ala80Gly, the other allele of patient 2, presented a low MAPP score, indicating an amino acid predicted to not substantially impair protein function at this position. We also performed MAPP scores of

the NKX2.5 dysfunctional variants Arg25Cys and Arg161Pro, previously described (5), and obtained elevated scores (Table 4).

Discussion

In this study of 157 infants with TD diagnosed by the State of Paraná Program for CH Neonatal Screening, in Brazil, we confirmed the contribution of *NKX2.5* gene to the pathogenesis of TD, firstly provided by Dentice et al. (5). The mutational screening of the entire *NKX2.5* coding sequence yielded four novel missense mutations in patients with thyroid ectopy. Interestingly, in the 4 subjects with *NKX2.5* mutations previously described, thyroid ectopy was present in 3 of them (5). Therefore, in the 8 subjects with TD presenting *NKX2.5* gene mutations described so far in the literature, thyroid ectopy is the phenotype in 7 of them, a finding that could suggest a possible role for *NKX2.5* in thyroid migration.

Our results indicate that the mutation rate of *NKX2.5* gene is very low in patients with TD (3%), even in a phenotype-focused study from a different genetic background. In fact, the recently published population-based study in a Czech cohort of 170 patients with CH, including 15 with CHD, has not found mutations on *NKX2.5* gene (16). Hypothetical mechanisms such as epigenetic or somatic changes could cause the inactivation of this gene (17). Alternatively, unknown genes might be involved in the pathogenesis of these TD cases. There is growing evidence indicating somatic nature and mosaicism of *NKX2.5* mutations in CHD (17, 18). Unknown genes, but functionally similar in the same embryonic pathway, might be involved in the pathogenesis of TD associated or not with CHD, as for example, the recent report indicating that deficiency of the T-box transcription factor Tbx1 results in hemiagenesis and hypoplasia of the thyroid gland due to a failure of the embryonic thyroid to establish contact with vessels derived from the cardiac outflow tract at a critical step necessary for the proper guidance of bilateral growth and lobulation (21). Further studies should be undertaken to clarify the exact molecular mechanisms by which these mutations lead to thyroid defects and to obtain in-depth information on the role of mutations of other transcription factors in the network of

NKX2.5 protein–protein interactions. Indeed, failure of cardiac transcription network as a result of the genetic instability in thyroid cells is a plausible pathway to TD.

The four novel missense mutations are predicted to result in codon change in the conserved amino–terminal TN domain (Asp16Glu) or throughout in the coding region (Ala80Gly, Asp105Glu, Ala119Ser, and Leu245Ile). Only one mutation (Asp16Glu) is in a very highly conserved region. In humans, in addition to the mutations described in TD, 29 different heterozygous germline *NKX2.5* mutations have been identified in patients suffering from CHD (19–22). Those previously reported mutations associated with CHD are more primarily localized within the homeodomain. By contrast, in this report, none of the patients positive for mutation had a CHD phenotype, neither had a mutation within the homeodomain. Although most published cases in CHD phenotype are in sequences affecting the homeodomain, there is no clear genotype–phenotype correlation. Cardiac malformations of these patients with *NKX2.5* germline mutations were mainly of atrial septal defect with or without AV block, although there were reports of patients with tetralogy of Fallot, ventricular septal defect, double–outlet right ventricle, interrupted aortic arch, truncus arteriosus, L–transposition of the great arteries, hypoplastic left heart syndrome and coarctation of the aorta. So, the spectrum of *NKX2.5* mutations is diverse in terms of mutation type, position of the affected amino acid and its predicted impact of the mutations on protein–protein interactions. In fact, experimental studies have shown that other portions of *NKX2.5*, even far away from the homeodomain, are also functionally very important (26).

MAPP scores have been shown to correlate with the degree of functional impairment of a mutated protein and with the severity of human disease (14, 23); hence, it would be possible to predict *NKX2.5* protein dysfunction by comparing the MAPP score of its amino acid substitutions. In our study, the mutation Asp16Glu, which is localized within a functionally critical region of the *NKX2.5*, presents a high MAPP score, which reflects extensive conservation of the corresponding sequence and physicochemical dissimilarity between wild–type and mutant residues. Other variants, Asp105Glu and

Ala119Ser, also demonstrated elevated MAPP scores. As expected, the variant Ala119Ser, described in this report and by the previous study (5), as well as the variant Arg161Pro, which exhibited documented functional impairment *in vitro*, reached very high MAPP scores (Table 4). The latter showed reduction of transactivation properties and dominant-negative effect, which was associated with reduced DNA binding. Therefore, MAPP scores quantified in our study were consistent with experimental data published so far.

Our results enforce that *NKX2.5* appears to be a likely candidate gene for thyroid ectopy. As in the heart, *NKX2.5* could have an essential role during the early thyroid morphogenesis, and be implicated as a partner of the genetic circuit controlling thyroidal cell specification and migration. Importantly, *NKX2.5* mutations are known to be central to the genesis of CHD and, in this case, might be necessary but not sufficient for TD. Further analysis of *NKX2.5*-mediated regulation of thyroid development is necessary to understand the committed cell migration by which *NKX2.5* mutations lead to TD.

References

1. **Park SM, Chatterjee VK** 2005 Genetics of congenital hypothyroidism. *J Med Genet* 42:379–389
2. **Gruters A, Krude H, Biebermann H** 2004 Molecular genetic defects in congenital hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 151 Suppl 3:U39–44
3. **Komuro I, Izumo S** 1993 Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8145–8149
4. **Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP** 1993 Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 119:969
5. **Dentice M, Cordeddu V, Rosica A, Ferrara AM, Santarpia L, Salvatore D, Chiovato L, Perri A, Moschini L, Fazzini C, Olivieri A, Costa P, Stoppioni V, Baserga M, De Felice M, Sorcini M, Fenzi G, Di Lauro R, Tartaglia M, Macchia PE** 2006 Missense mutation in the transcription factor NKX2-5: a novel molecular event in the pathogenesis of thyroid dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1428–1433
6. **Biben C, Palmer S, Elliott DA, Harvey RP** 1997 Homeobox genes and heart development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62:395–403
7. **Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG** 1998 Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science* 281:108–111
8. **Benson DW, Silberbach GM, Kavanaugh-McHugh A, Cottrill C, Zhang Y, Riggs S, Smalls O, Johnson MC, Watson MS, Seidman JG, Seidman CE, Plowden J, Kugler JD** 1999 Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest* 104:1567–1573
9. **McElhinney DB, Geiger E, Blinder J, Benson DW, Goldmuntz E** 2003 NKX2.5 mutations in patients with congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 42:1650–1655
10. **Hirayama-Yamada K, Kamisago M, Akimoto K, Aotsuka H, Nakamura Y, Tomita H, Furutani M, Imamura S, Takao A, Nakazawa M, Matsuoka R** 2005 Phenotypes with GATA4 or NKX2.5 mutations in familial atrial septal defect. *Am J Med Genet A* 135:47–52
11. **Roberts HE, Moore CA, Fernhoff PM, Brown AL, Khoury MJ** 1997 Population study of congenital hypothyroidism and associated birth defects, Atlanta, 1979–1992. *Am J Med Genet* 71:29–32
12. **Olivieri A, Stazi MA, Mastroiacovo P, Fazzini C, Medda E, Spagnolo A, De Angelis S, Grandolfo ME, Taruscio D, Cordeddu V, Sorcini M** 2002 A population-based study on the frequency of additional congenital malformations in infants with congenital

- hypothyroidism: data from the Italian Registry for Congenital Hypothyroidism (1991–1998). *J Clin Endocrinol Metab* 87:557–562
13. **Stone EA, Cooper GM, Sidow A** 2005 Trade-offs in detecting evolutionarily constrained sequence by comparative genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6:143–164
 14. **Stone EA, Sidow A** 2005 Physicochemical constraint violation by missense substitutions mediates impairment of protein function and disease severity. *Genome Res* 15:978–986
 15. **Miyague NI, Cardoso SM, Meyer F, Ultramari FT, Araujo FH, Rozkowisk I, Toschi AP** 2003 Epidemiological study of congenital heart defects in children and adolescents. Analysis of 4,538 cases. *Arq Bras Cardiol* 80:269–278
 16. **Al Taji E, Biebermann H, Limanova Z, Hnikova O, Zikmund J, Dame C, Gruters A, Lebl J, Krude H** 2007 Screening for mutations in transcription factors in a Czech cohort of 170 patients with congenital and early-onset hypothyroidism: identification of a novel PAX8 mutation in dominantly inherited early-onset non-autoimmune hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 156:521–529
 17. **Reamon-Buettner SM, Borlak J** 2004 Somatic NKX2-5 mutations as a novel mechanism of disease in complex congenital heart disease. *J Med Genet* 41:684–690
 18. **Reamon-Buettner SM, Hecker H, Spanel-Borowski K, Craatz S, Kuenzel E, Borlak J** 2004 Novel NKX2-5 mutations in diseased heart tissues of patients with cardiac malformations. *Am J Pathol* 164:2117–2125
 19. **Kasahara H, Benson DW** 2004 Biochemical analyses of eight NKX2.5 homeodomain missense mutations causing atrioventricular block and cardiac anomalies. *Cardiovasc Res* 64:40–51
 20. **Gutierrez-Roelens I, De Roy L, Ovaert C, Sluysmans T, Devriendt K, Brunner HG, Vikkula M** 2006 A novel CSX/NKX2-5 mutation causes autosomal-dominant AV block: are atrial fibrillation and syncopes part of the phenotype? *Eur J Hum Genet* 14:1313–1316
 21. **Sarkozy A, Conti E, Neri C, D'Agostino R, Digilio MC, Esposito G, Toscano A, Marino B, Pizzuti A, Dallapiccola B** 2005 Spectrum of atrial septal defects associated with mutations of NKX2.5 and GATA4 transcription factors. *J Med Genet* 42:e16
 22. **Rifai L, Maazouzi W, Sefiani A** 2007 Novel point mutation in the NKX2-5 gene in a Moroccan family with atrioventricular conduction disturbance and an atrial septal defect in the oval fossa. *Cardiol Young* 17:107–109
 23. **Kashuk CS, Stone EA, Grice EA, Portnoy ME, Green ED, Sidow A, Chakravarti A, McCallion AS** 2005 Phenotype-genotype correlation in Hirschsprung disease is illuminated by comparative analysis of the RET protein sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8949–8954

Acknowledgements

This work was supported by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP), grant 06/54950-6 and by Fundação Araucária, grant Programa de Pesquisa para o SUS 9348. The authors are grateful to Janete M. Cerutti and Rosana Tamanaha for helpful discussions, to Teresa Kasamatsu and Ilda Kunii for their excellent technical assistance and to Angela Faria, Gianna Cussatis and Elisabete Coelho for their secretarial support and to Professor Massimo Tonacchera for sequencing assistance. We appreciate the cooperation of all patients, their families, and endocrinologists involved in their care.

Table 1. NKX2.5 mutations identified among 157 patients with TD

Patient	Mutation	Site	Thyroid Phenotype	Cardiac Phenotype
1	C48A (Asp16Glu)	TN domain	Ectopy	Benign systolic murmur
2	C239G (Ala80Gly)	coding region	Ectopy	Normal
	C315G (Asp105Glu)	coding region		
3	C733A (Leu245Ile)	coding region	Ectopy	Normal
4	G355T (Ala119Ser)	coding region	Ectopy	Normal

Table 2. Phenotype and NKX2.5 Genotype in patients with both TD and CHD

Patient	Gender	Thyroid Phenotype	Cardiac Phenotype	NKX2.5 Genetic Abnormality
1	Female	Ectopy	ASD	Glu21Glu
2	Male	Ectopy	TV Insuficiency	No
3	Female	Ectopy	PDA	No
4	Female	Ectopy	Right bundle branch block	No
5	Female	Ectopy	VSD	No
6	Female	Ectopy	ASD + VSD	No
7	Female	Ectopy	ASD	Ala29Ala
8	Female	Hypoplasia	ASD	No
9	Male	Hypoplasia	ASD	No
10	Female	Hypoplasia	BAV	No
11	Male	Hypoplasia	VSD	Glu21Glu
12	Female	Hypoplasia	PDA	No
13	Male	Agenesys	PE	Glu21Glu
14	Male	Agenesys	VSD	No
15	Male	Hemiagenesys	AV Block	Glu21Glu
16	Male	Hemiagenesys	BAV	No
17	Male	Hemiagenesys	BAV	No

ASD: secundum atrial septal defect; PDA: patent ductus arteriosus; VSD: ventricular septal defect; PE: pulmonar stenosis; BAV: bicuspid aortic valve; TV: Tricuspid valve; AV: atrioventricular

Table 3. NKX2.5 polymorphisms identified among 157 patients with TD

Polymorphism	Site	Polymorphism type	Allele Frequency in patients	Allele Frequency in controls
A63G(Glu21Glu)	TN domain	Silent	A/G 0,110 G/G 0,007 A/A 0,883	A/G 0,160 G/G 0,000 A/A 0,840
C87A(Ala29Ala)*	TN domain	Silent	C/A 0,018 A/A 0,000 C/C 0,982	C/A 0,000 A/A 0,000 C/C 1,000
C225A(Arg75Arg) *	Coding region	Silent	C/A 0,010 A/A 0,000 C/C 0,990	C/A 0,000 A/A 0,000 C/C 1,000
G293A(Ser98Asn)*	Coding region	Non silent	G/A 0,007 A/A 0,000 G/G 0,993	G/A 0,060 A/A 0,000 G/G 0,940
G541A(Gln181Gln)*	Homeodomain	Silent	G/A 0,021 A/A 0,000 G/G 0,979	G/A 0,000 A/A 0,000 G/G 1,000
G594A(Gln198Gln)	Coding region	Silent	G/A 0,003 A/A 0,000 G/G 0,997	G/A 0,000 A/A 0,000 G/G 1,000

*Not previously reported NKX2.5 polymorphisms (Genbank NT 023133)

Table 4. MAPP score for each NKX2.5 mutations identified among patients with TD

Mutation	Alignment	MAPP Score	P ≤ 0.01	Prediction
Asp16Glu*	DDDDDD	23.98	YES	BB
Arg25Cys ϕ	RRRRRR	29.01	YES	BB
Ala80Gly*	AAAAPP	5.26	NO	BA
Asp105Glu*	DDDDDD	23.98	YES	BB
Ala119Ser* ϕ	AAAAAA	23.39	YES	BB
Arg161Pro ϕ	RRRRRR	40.70	YES	BB
Leu245Ile*	LLLLLL	15.46	YES	BB

*mutations described in this report; ϕ : mutations described in reference 5; P: P-value interpretations of the MAPP scores, predicting the impact of each amino acid variant; BA: Good amino acid, predicted to not substantially impair protein function at this position; BB: Bad amino acid, predicted to be deleterious at this position

Figure 1

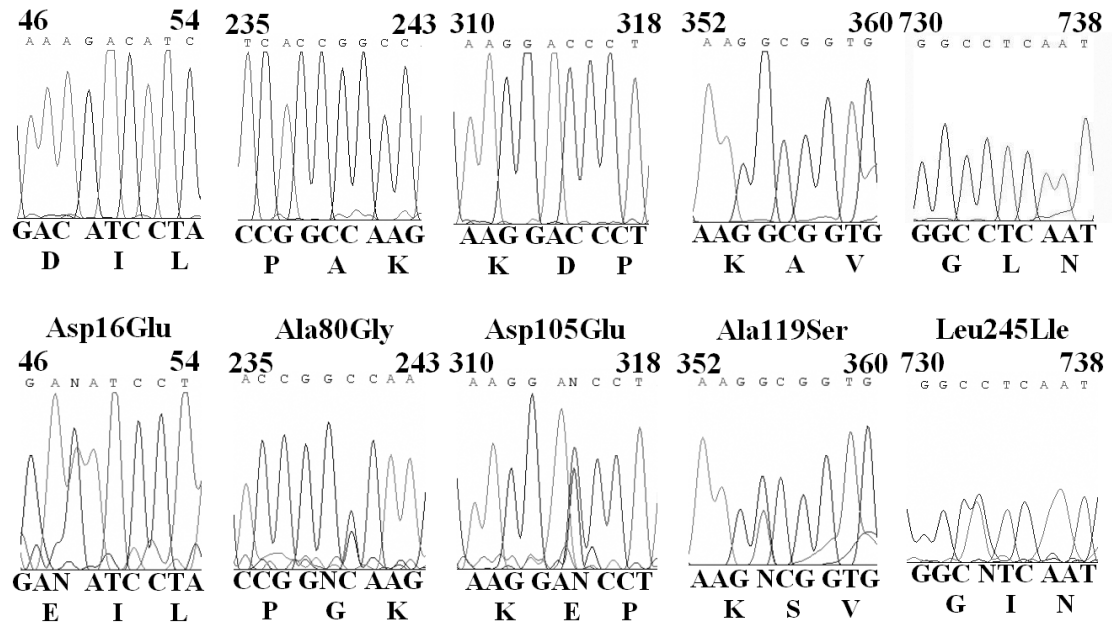


Figure 2

	E		G
Homo_sapiens	MFPSPALTPPFVVDLLNLEQQQRSLAAAGEL	SARLEATLAPSSCMLA	AFKPEAYAGPEAAAPGLPELRAELGRAPSPAKCASA
Pan_troglodytes	MFPSPALTPPFVVDLLNLEQQQRSLAAAGEL	SARLEATLAPSSCMLA	AFKPEAYAGPEAAAPGLPELRAELGRAPSPAKCASA
Bos_taurus	MFPSPALTPPFVVDLLNLEQQQRSLAA-GEL	SARLEATLAPASCMLA	AFKPEAYAGPEAAAPGPFPELRAELGPAPSPAKCAPAFSAAPAF
Canis_familiaris	MFPSPALTPPFVVDLLNLEQQQRSLAA-GEL	SARLEATLAPASCMLA	AFKPEAYAGPEAAAPALPELRAELGPAPSPAKCAPAFPGAPAF
Mus_musculus	MFPSPALTPPFVVDLLNLEQQQRSLAS-GDL	SARLEATLAPASCMLA	AFKPEAYSGPEAAASGLAELRAEMGPAPSPAKCSPA
Rattus_norvegicus	MFPSPALTHTPPFVVDLLNLEQQQRSLAA-GDL	SARLEATLAPASCMLA	AFKPEAYSGPEAAAPGLAELRAELGPAPSPAKCSPA
Homo_sapiens	YPRAY DDPDAKD	PRAEKKELCALQKAVELEKTEADNAERPRARRRRKPRVLF	SQAQVYELERRFKQQRVLSAPERDQLASVLKLTSTQVK
Pan_troglodytes	YPRAY DDPDAKD	PRAEKKELCALQKAVELEKTEVDNAERPRARRRRKPRVLF	SQAQVYELERRFKQQRVLSAPERDQLASVLKLTSTQVK
Bos_taurus	YPRAY DDPDAKD	HRADKELCALQKAVELEKPESDSAERPRARRRRKPRVLF	SQAQVYELERRFKQQRVLSAPERDQLASVLKLTSTQVK
Canis_familiaris	YPRAY DDPDAKD	PRADKELCSLQKAVELEKPEADGAERPRARRRRKPRVLF	SQAQVYELERRFKQQRVLSAPERDQLASVLKLTSTQVK
Mus_musculus	YPGAY DDPDAKD	PRADKELCALQKAVELDKAETDGAERPRARRRRKPRVLF	SQAQVYELERRFKQQRVLSAPERDQLASVLKLTSTQVK
Rattus_norvegicus	YPRAY DDPDAKD	PRADKELCALQKAVELDKAETDGAERPRARRRRKPRVLF	SQAQVYELERRFKQQRVLSAPERDQLASVLKLTSTQVK
	E	S	
Homo_sapiens	IWFQNR	RYKCKRQRDQ	TLELVGLPPPPPP-ARRIAVPVLRD
Pan_troglodytes	IWFQNR	RYKCKRQRDQ	TLELVGLPPPPPP-PARRIAVPVLRD
Bos_taurus	IWFQNR	RYKCKRQRDQ	TLELVGLPPPPPP-ARRIAVPVLRD
Canis_familiaris	IWFQNR	RYKCKRQRDQ	TLELVGLPP-PPP-ARRIAVPVLRD
Mus_musculus	IWFQNR	RYKCKRQRDQ	TLELLG-PPP--PP-ARRIAVPVLRD
Rattus_norvegicus	IWFQNR	RYKCKRQRDQ	TLELLG-PPP--PP-ARRIAVPVLRD
			I

Legend to Figure 1. Electropherograms showing the 5 missense NKX2.5 mutations in patients with thyroid ectopy, Asp16Glu, Ala80Gly, Asp105Glu, Ala119Ser and Leu245Ile. The upper electropherogram shows the wildtype sequence

Legend to Figure 2. Human NKX2.5 sequence including 300 of the total 324 amino acids and multiple sequence alignments with 5 orthologs. The shaded boxes indicate the conserved TN domain (residues 10 to 21), the homeodomain (residues 138 to 197) and the NK2 domain (residues 212 to 234). Positions of reported mutations are underlined and codon changes listed below. D: aspartic acid; E: glutamic acid; G: glycine; P: proline; D: aspartic acid; S: serine; L: leucine; I: isoleucine

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA AS PRÓXIMAS ETAPAS

1. A prevalência de HC na população do Paraná foi de 1:3953 recém-nascidos;
2. DT foi a causa mais frequente de HC, representando 72% dos casos;
3. Houve predominância do sexo feminino apenas nos casos de ectopia ($z= 5.12$; $P<0.0001$);
4. Houve prevalência elevada de malformações cardíacas (7.3%) na população de HC quando comparada à população geral (0.05%);
5. Houve significativo aumento de risco para cardiopatia entre os pacientes portadores de Hipoplasia e Hemiagenesia;
6. Existe um padrão hormonal distinto entre os diversos subgrupos de DT (valores de TSH), com decréscimo na severidade do hipotireoidismo, com a idade, observada nos casos de Hipoplasia;
7. Entre os genes candidatos estudados (*PAX8*, *TSH-R* e *NKX2.5*) nos 35 pacientes com hipoplasia tiroidiana encontramos mutação apenas no gene *PAX8*, R52P, no exon 3, a qual fomos os primeiros a relatar. Não encontramos mutação nos genes *TSH-R* e *NKX2.5* nos pacientes com hipoplasia;
8. A prevalência de mutações do gene *NKX2.5* na amostra de 157 casos da população com DT foi baixa (3%). As mutações não se associaram à presença de cardiopatia congênita;
9. Encontramos 5 mutações (4 novas e 1 já descrita) no gene *NKX2.5* em pacientes com DT. Todas as mutações no gene *NKX2.5* descritas neste trabalho associaram-se ao fenótipo de ectopia. Este achado pode indicar que o gene *NKX2.5* como o primeiro gene humano implicado na fisiopatologia da migração tiroidiana.

Estas conclusões são fortalecidas porque a análise clínica e epidemiológica realizou-se em parcela expressiva (78%) dos casos diagnosticados de HC no Estado do Paraná; além disso, é a maior casuística de DT da literatura que foi avaliada clinicamente, por cintilografia e/ou ultra-sonografia.

Estas conclusões permitem que possamos fazer sugestões para próximas etapas de trabalho:

1. Apesar de que os valores elevados de MAPP encontrados nas mutações tenham sido consistentes com estudos funcionais realizados previamente, o estudo funcional das novas mutações descritas, acompanhados da análise complementar das vias de regulação do gene *NKX2.5*, serão necessários para melhor entendimento de seus mecanismos de ação;
2. Grupos de pesquisa em desenvolvimento da tiróide deverão estudar melhor o papel do gene *NKX2.5* no circuito genético de controle da morfogênese e organogênese tireoidiana;
3. Pediatras que acompanham as crianças com HC poderão criar protocolo individualizados de tratamento e seguimento para os diversos subgrupos de DT, uma vez que estes subgrupos divergem em seus padrões hormonais e, provavelmente, também na evolução, prognóstico e etiologia molecular;
4. o protocolo diagnóstico etiológico utilizando rhTSH poderia ser realizado nos casos de Hipoplasia e Agenesia com tiroglobulina detectável, para uma melhor caracterização clínica, prognóstica e de direcionamento do estudo genético.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)