

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

**PROCURA DA MUTAÇÃO CAUSADORA DE RETARDO
PSICOMOTOR SEVERO LIGADO AO X,
SÍNDROME DE ALLAN-HERNDON-DUDLEY,
EM UMA FAMÍLIA DO ESTADO DE MINAS GERAIS.**

Décio Gonçalves das Oliveiras

Belo Horizonte - Minas Gerais

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Décio Gonçalves das Oliveiras

**PROCURA DA MUTAÇÃO CAUSADORA DE RETARDO
PSICOMOTOR SEVERO LIGADO AO X,
SÍNDROME DE ALLAN-HERNDON-DUDLEY,
EM UMA FAMÍLIA DO ESTADO DE MINAS GERAIS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral, da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Ana Lúcia Brunialti Godard

Co-orientadora: Eugênia Ribeiro Valadares

Belo Horizonte - Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas

2010



Pós-Graduação em Genética
Departamento de Biologia Geral, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570




"Procura da mutação causadora de retardo psicomotor severo ligado ao X, Síndrome de Allan-Herndon-Dudley, em uma família do estado de Minas Gerais."

Decio Gonçalves Das Oliveiras

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Profª Ana Lúcia Brunialti Godard - Orientadora
UFMG


Profª Iscia Lopes Cendes
UNICAMP


Profª Maria Raquel Santos Carvalho
UFMG

Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2010.

Apoio Financeiro

Este trabalho foi realizado com auxílio das instituições:



- SUS – MG, Sistema Único de Saúde de Minas Gerais



- SEE–MG - Secretaria de Estado da Educação de Minas Gerais.



- Programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais

Ao meu pai José Leão das Oliveiras, pelo exemplo de retidão, força, integridade, amor e devoção a família.

À minha mãe Divina Gonçalves das Oliveiras, pela dedicação, amor e atenção constantes.

Aos meus tios Geraldo e Sílvia pelo aconchego de uma vida.

À minha família, que firmam meus pés na realidade do caminho e alimentam meu buscar...

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard pela orientação, oportunidade e credibilidade oferecida.

À Profa. Dra. Eugênia Ribeiro Valadares, pela colaboração indispensável à realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Genética Animal e Humana, Aninha, Adriana, Andrea, Guilherme, Anna Carolina, Bruno, Mayara, Daniel, Lilian, pela convivência agradável e interativa que muito contribuiu no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Marcadores Moleculares, Anderson Oliveira, Isabella, Marcele, Tatiana, Flávia, Ericka; Tatiane, Egiancarla, Luís, Camila, do Laboratório de Genética Humana e Médica, Marlene, Raphael, Izinara, Gutemberg; do Laboratório de Microorganismos, Natália, Patrícia, Flaviane, e dos demais laboratórios, Latife, Giordano, Anderson Vieira, Letícia Piancastell, Luciana Cunha, Luciana Werneck pela interação, ajuda e convivência.

Aos professores, Profa. Dra. Maria Raquel, Prof. Dr. Eduardo M. Tarazona, Profa. Dra. Maria Bernadete, Prof. Dr. Vasco Ariston, Prof. Dr. Evanguedes, Prfa. Dra. Cleusa, Prof. Dr. Álvaro, Prfa. Dra. Ana Lúcia pela contribuição na formação.

Aos funcionários do departamento pela presteza e colaboração.

Aos colegas de mestrado Márcia Lobão, Luciana, Letícia, Anderson, pela amizade ajuda e convivência.

AGRADECIMENTO

Meus agradecimentos sinceros,

Aos meus pais pelo carinho, amor, tolerância, apoio, incentivo sempre e paciência na minha ausência em momentos de presença necessária.

Aos meus tios Sílvia e Geraldo Pires, pelo aconchego, amor e compreensão.

Às minhas primas irmãs Mágda e Sílvia Renilda pelos cuidados dispensados aos meus pais na minha ausência, pelo incentivo, apoio concreto, e carinho incondicional.

A minha irmã Sandra, sensibilidade e carinho, mesmo a distância.

À minhas sobrinhas Sâmara e Laís, por me presentarem como um “Tio Dedé” que me enche de orgulho, e por me realizarem enquanto tio.

As minhas afilhadas Maria Luíza, Laís e Magali pelos afagos, carinhos e ensinamentos de distração

Ao primo Marcos Roberto, pela crença na minha intenção de pesquisar...

Aos amigos distantes, Ilma, Célia, Claudia, Tarcísio Petter, Amauri, Flávio, Isamara, Raiane, Cleudimar, Elicássia, Bruno, Amanda, Jaine, Marialcina, Ir. Luíza, Ir. Irene, Dalice, Neusa, Vanusa pela força e participação implícita ou explícita nas minhas conquistas.

Aos amigos conquistados na trajetória, Adilson, Claudinei, Geraldo Washington, Roberto, Marcelo, Cida, Thiago, Ricardo, André, Eduardo, Anderson, Izinara, Raphael, Adriana, Andréia, Maurício, pelo incentivo emocional, apoio nas horas necessárias, por compartilhar comigo suas atenções, contribuir para amenizar as dificuldades, ampliar os momentos de felicidade, enfim pela amizade.

Aos colegas de trabalho, Andréia, Dora, Ângela, Zezé, Lucimar, Marialcina, Érica, Ir Luiza, Ir Irene, Waldirene, Alessandra, Cristina Sá, Neusa, Rônia pela amizade e influência na decisão e execução desse projeto.

À minha família, a eles devo a paciência em todos os momentos desse trabalho, compreensão pelas vezes que não pude dar atenção... seja pela ausência física ou espiritual.

A todos, muitos, que se fizeram presentes, contribuíram para que a modificação em mim se fizesse, meu muito obrigado.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHDS -	Síndrome de Alan-Herndon-Dudley
Bp -	Pares de bases
D2 -	Deiodinase 2
D3 -	Deiodinase 3
DG -	Doenças genéticas
DMH -	Doenças metabólicas hereditárias
EDTA -	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIM -	Erros inatos do metabolismo
FT4 -	Tetraiodotironina livre
<i>hMCT8</i> -	Gene <i>MCT8</i> humano
ICB -	Instituto de Ciências Biológicas
ISH -	(<i>in situ</i> hybridization histochemistry) hibridação histoquímica <i>in situ</i>
K0 -	Linhagem nocaute
Kb -	Kilo bases
LAT -	Transportadores de L-aminoácidos (L-type amino acid transporters)
LT3 -	T3 livre
LT4 -	T4 livre
MCT8 -	Transportador de Monocarboxilato 8
NTPC -	Polipeptídeo co-transportador de Na ⁺ -taurocholate (Na ⁺ - <i>taurocholate cotransporting polypeptide</i>)
OATPC1 -	Organic anion-transporting polypeptide (Polipeptídeo transportador de anions orgânicos)
OMIM -	Online Mendelian Inheritance in Man (Herança mendeliana on line humana)
PCR -	Reação em cadeia de polimerase
PEST -	Domínio protéico N-terminal, constituído de resíduos de Prolina (P), Glutamato (E), Serina (S), e Treonina (T)
PVN -	Neurônio paraventricular

(r)MCT8 -	MCT8 de ratos
rT3 -	T3 reverso
RT-PCR -	Real Time PCR – Reação em cadeia de polymerase em tempo real
SINASC -	Sistema de informações sobre nascidos vivos
<i>SLC16A2</i> -	Solute carrier family 16, member 2 (Família dos transportadores de soluto família 16, membro 2.
SNC -	Sistema Nervoso Central.
SUS -	Sistema Único de Saúde
T2 -	Iodotironina inativa
T3 -	L-3,5,3'-triiodotironina
T4 -	L-3,5,3',5'-tetraiodotironina
HT -	Hormônio Tireoidiano
TCE -	Tomografia computadorizada de encéfalo.
TLS -	Translation start site (Sítios de iniciação da transcrição)
TMD -	Domínio trans-membrana
TR -	Receptor de hormônio Tireóideo
TRH -	Hormônio liberador de tirotrófina
TSH -	Hormônio Tireóideo estimulante.

RESUMO

A Síndrome Allan-Herndon-Dudley (AHDS), foi descrita por William, Allan e colaborador Dudley em 1944. Caracterizada clinicamente por hipotonia, hipoplasia muscular e retardo no desenvolvimento e mental, face longa e fina, contraturas articulares e hiporeflexia.

A doença é caracterizada por retardo mental ligada ao X e sua frequência entre a população geral com retardo mental (RM) é difícil de ser estimada. Até o momento, estima-se uma frequência de 1/10.000 homens com RM (SCHWARTZ, 2005).

AHDS é uma doença causada por mutação no gene transportador de monocarboxilato 8 (*MCT8*), localizado no cromossomo X (Xq13.2). A doença é herdada de forma recessiva ligada ao X e possui penetrância completa, expressividade variável atingindo homens hemizigóticos com mutação, filhos de mulheres portadoras de mutação no *MCT8* (MULLER *et al.*, 2002).

Mutações presentes no gene *MCT8* podem levar a uma deficiência funcional, à capacidade residual de transporte com reduzida afinidade ao substrato e até mesmo manifestar a perda funcional total do transportador (*stop* códon prematuro ou degradação rápida) (JANSEN *et al.*, 2008). Esse transporte anormal reflete em níveis séricos elevados de T3 livre e decréscimo dos níveis de T4 livre ao longo dos quais se desenvolvem características clínicas peculiares.

O diagnóstico de AHDS é essencialmente clínico, baseado na anamnese e história clínica do paciente com auxílio diagnóstico por ensaios bioquímicos de quantificação do nível sérico de hormônios tireoideanos (TSH, LT3 e LT4).

O presente estudo faz parte de um projeto maior “ESTUDO DE DOENÇAS HEREDODEGENERATIVAS EM MINAS GERAIS – Estabelecimento de uma Rede para Diagnóstico, Acompanhamento e Aconselhamento Genético” – que propõe a investigação de doenças degenerativas e/ou metabólicas do sistema nervoso e ocular, em que um número expressivo de pessoas possa vir a se beneficiar do diagnóstico, acompanhamento e aconselhamento genético.

Como premissa para início da pesquisa foi feita uma busca no banco de dados do OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*), na tentativa de levantar todas as patologias

possíveis para sintomatologia do probando e foi obtido um resultado indicando fortemente o diagnóstico de AHDS. Incorporando como termos de busca as descrições sintomáticas do probando a única doença ligada ao sexo possível, dentre as listadas, foi a AHDS.

A hipótese diagnóstico foi considerada forte baseada na sintomatologia observada e história familiar.

Com o objetivo de estudar os genótipos dos integrantes da família alvo, a fim de identificar uma mutação em regiões codificantes do gene *MCT8* que ocasiona a síndrome de Allan-Herndon-Dudley, foram feitas, coletas de sangue venoso dos pacientes, purificação do DNA genômico, amplificação das regiões exônicas e adjacências (regiões de recomposição), sequenciamento e alinhamento com a sequência referência obtida no banco de dados on-line do *Ensembl*.

Não foram encontradas evidências moleculares de alteração na sequência de bases nitrogenadas com relação ao controle negativo e a sequência referência.

Conclui-se então, que serão necessários estudos complementares para que o diagnóstico molecular seja efetivado.

PALAVRAS-CHAVE: Síndrome de Allan-Herndon-Dudley (AHDS), Transportador de monocarboxilato 8, *SLC16A2*, hipotonia neonatal, retardo desenvolvimental, hormônios tireóidicos, genética médica.

ABSTRACT

The Allan-Herndon-Dudley Syndrome (AHDS) was described by William Allan and his fellow Dudley, in 1944. Clinically characterized as hypotonia, muscle hypoplasia mental and developmental retard, face long and thin, knee contractures contractures to articulate, and hyporeflexia.

The disease is characterized by mental retard linked to the X chromosome, and its frequency among the general population with a mental retard(MR)is difficult to be estimated. However it can be well trusted that, at present, the estimated frequency is around 1 in 10.000 men with MR (SCHWARTZ, 2005).

AHDS is caused by mutations of the monocarboxylate transporter 8 (MCT8), located in the X chromosome (Xq13.2). It is inherited as a recessive disease linked to the X chromosome and shows complete penetrance, variable expressivity , affecting hemizygotic men with a mutation, children of women carrying the mutation in MCT8 (MULLER et al, 2002).

Mutations of the MCT8 gene can lead to a functional deficiency with residual capacity of the transporting and reduced affinity to the substratum, and total functional loss of the transporter (when it results on a premature stop codon or when it causes fast degradation) (JANSEN et al., 2008). This abnormal transport reflects on elevated serum levels of free T3, and decrease of free T4 levels, resulting in the peculiar clinical characteristics of the disease.

The AHDS diagnosis is essentially clinical, based on clinical anamneses, history of the patient, and diagnosis through biochemical tests that measure the serum levels of the thyroid hormones (TSH, T3F, T4F).

The present study is part of a major project entitled “ESTUDO DE DOENÇAS HEREDODEGENERATIVAS EM MINAS GERAIS – Estabelecimento de uma Rede para Diagnóstico, Acompanhamento e Aconselhamento Genético” (Study of heredodegeneratives illness in Minas Gerais state - establishing a network for diagnosis, follow-up, and genetic guidance) which aims at researching degenerative and/or metabolic diseases that affect the nervous and the ocular systems. With this project, an expressive number of people may be beneficiary of the results of this important work on genetics.

To set standards and as part of a main issue for a initial research, a search was launched on the databases of the OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), intending to find all possible pathologies for the symptomatic description of the proband, and the result obtained strongly indicated the diagnosis of AHDS. Considering a main frame in the search is the proband's symptomatic descriptions, the only disease among those listed and linked to the possible sex, was the AHDS.

A hypothetical diagnosis was primarily and strong considered based on the patient's symptoms, following-up the roots of the family history.

With the purpose of studying the integrated genotypes of the target family, and aiming to identify a mutation in the codified regions of MCT8 gene, which causes the Allan-Herndon-Dudley Syndrome, several venous blood samples were collected from the patients, and genomic DNA purification was performed and followed by the amplification of the exonic regions and surrounding areas (recomposition regions), and the sequencing and alignment with the reference sequences obtained from the online data bank Ensembl.

The results did not show evidence of any molecular alteration in the sequence of nitrogenous bases, in comparison to the negative control and the reference sequence. Therefore, its quite fair to conclude that further steps and studies should be taken so that a proper and definitive molecular diagnosis may become effective.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	Esquema de organização do gene <i>MCT8</i> (<i>SLC16A2</i>).....	20
FIGURA 2 -	Representação esquemática do transportador de hormônio tireoidiano e deiodinação na célula alvo.....	23
FIGURA 3 -	Heredograma da família estudada com todos os seus membros.....	31
FIGURA 4 -	Fotografia da padronização da amplificação do éxon 2 (Ex2), éxon 3 (Ex3), éxon 4 (Ex4), éxon 5 (Ex5) e éxon 6 (Ex6) do gene <i>MCT8</i> humano.....	38
FIGURA 5 -	Eletroferogramas exibido no software CodonCodeAligner após o sequenciamento de amplicons do éxon 1 do probando, da sua mãe e do controle negativo, com alinhamento para verificação de discrepâncias na sequência de bases nitrogenadas.....	39
FIGURA 6 -	Resultado de alinhamento do sequenciamento do éxon 1 com a sequência referência.....	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Visão geral das mutações no gene MCT8 de pacientes com AHDS (2004-2009).....	26
TABELA 2 -	Relação de sequências nucleotídicas utilizadas como primers na amplificações por PCR.....	34
TABELA 3 -	Comparação entre a sintomatologia de pacientes com AHDS e do Probrando	43
TABELA 4 -	Constando de sequência nucleotídica dos éxons do gene MCT8 (SLC16A2) com regiões intrônicas, exônicas e marcação simbólica dos primers e sua localização	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	29
2.1	Objetivos Gerais.....	29
2.2	Objetivos Específicos.....	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1	Casuística.....	30
3.1.1	O Probando.....	30
3.1.2	História familiar.....	31
3.1.3	Pacientes.....	32
3.2	Amostra Estudada.....	32
3.3	Genotipagem.....	32
4	RESULTADOS.....	38
4.1	Análise dos amplicons.....	38
4.2	Análise dos eletroferogramas.....	39
4.3	Alinhamento.....	40
5	DISCUSSÃO.....	41
6	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46
	ANEXOS.....	55

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Metabólicas Hereditárias (DMH) - causadas por erros inatos do metabolismo (EIM) - são individualmente raras, porém, quando se consideram em conjunto, a incidência é de uma para cada 2.500 recém-nascidos. Para se ter uma idéia dessa frequência, no Estado de Minas Gerais em 2007, segundo- Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos – SINASC, nasceram 258.469, quase 260.000 mil crianças por ano e em Belo Horizonte 42.184, cerca de 42 mil. Se num cálculo simplista, considerarmos uma manutenção da taxa de nascimentos, representaria uma aproximação de 104 novos pacientes por ano no estado. Neste contexto temos a dimensão da necessidade de ações de políticas públicas de saúde que atendam a demanda crescente.

Serviço que atenda aos acometidos de doenças do subgrupo doenças genéticas (DG) pertencentes ao grupo de doenças metabólicas hereditárias (DMH) raras, com caráter degenerativo progressivo tratáveis são uma urgência na rede de saúde pública. São doenças que necessitam de atendimento especializado e complexo, e cujo tratamento é de fundamental importância na atenção à saúde, sendo consideradas partes integrantes de um conjunto de direitos chamados de direitos sociais. No Brasil este direito apenas foi reconhecido na Constituição Federal de 1988, citado no artigo 196: “A saúde é direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doença e de outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para a promoção, proteção e recuperação”.

O tratamento das doenças complexas é feito pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e requer atendimento de uma equipe de profissionais de saúde multidisciplinar especializada que é determinante na ação de integração na sociedade, e até mesmo a assistência total a saúde, além de ações de detecção precoce, reabilitação e prevenção terciária promovendo a saúde do paciente, e a assistência social à família.

No Brasil, os resultados do Projeto Genoma Humano refletiram de forma favorável na formação de grupos de pesquisa em genética humana e estimulou um novo mercado de trabalho voltado para a genética médica. De igual importância, foi a antecipação da comunidade científica para o estudo das implicações bioéticas de tais pesquisas em seres humanos proporcionando, em consequência, a criação dos Comitês de Ética em Pesquisa vinculados ao Conselho Nacional de Saúde, já em vigor no Brasil desde 1995.

Independentemente dos serviços, dos centros de excelência acadêmica e das agências de fomento à pesquisa estarem motivados e sensibilizados para a questão das doenças genéticas, programas epidemiológicos nacionais ou mesmo regionais que visem delinear o espectro das doenças genéticas e, conseqüentemente, suas frequências na população brasileira são ainda insuficientes diante das necessidades. Um segundo problema que pode ser levantado, refere-se à localização desses serviços especializados e, portanto, ao número de famílias que têm acesso a eles. Podemos constatar que esses serviços estão localizados exclusivamente nos grandes centros urbanos. Em Minas Gerais, por exemplo, limita-se à capital, Belo Horizonte.

O Ambulatório de Doenças Metabólicas do Hospital das Clínicas da UFMG atua junto com o Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo desde 1999 e com o Laboratório de Genética Animal e Humana desde 2004, prestando atendimento ambulatorial, laboratorial e testes moleculares a pacientes da rede pública. O atendimento ambulatorial é semanal e engloba atenção neurológica, genética, endocrinológica e nutricional aos pacientes, com cerca de 400 atendimentos por ano. No serviço, são atendidas famílias com vários membros acometidos em gerações sucessivas, sendo proposto um diagnóstico clínico. Tem-se então, o início de uma investigação científica voltada para o diagnóstico definitivo e o tratamento mais acertado, através de um caso índice, com o referenciamento dos demais casos familiares detectados a partir deste inicial. Em algumas famílias, a doença descende de várias gerações anteriores, sem um diagnóstico clínico-laboratorial. A falta de diagnóstico laboratorial leva a dificuldades na confirmação do diagnóstico clínico, necessária a uma intervenção medicamentosa mais acertada e específica junto ao paciente. Quando diante de um quadro de dificuldade de diagnóstico laboratorial, aliado ao diagnóstico clínico não comprovado, há uma perda do interesse, no tratamento clínico, pela maior parte dos médicos, com evidente repercussão no acompanhamento dos afetados, que se sentem muito frequentemente abandonados. Diante desse quadro, tem-se trabalhado intensivamente na assistência diagnóstica, propondo projetos e assumindo casos de diagnóstico clínico difícil, sem infraestrutura facilitadora, já que é uma nova área da medicina. No Brasil existem poucos serviços que prestam atendimento similar, o qual requer formação médica especializada e muito empenho na anamnese, interação e envolvimento da equipe médica e pacientes afetados ou portadores das famílias do caso índice. Entretanto, o atendimento prestado pelo ambulatório e pelos laboratórios colaboradores ainda consiste em um esforço pequeno, mas significativo,

diante da grande e crescente necessidade de diagnóstico clínico-laboratorial e tratamento das doenças genéticas hereditárias.

A fim de estruturar de forma eficaz a atenção médica especializada, optou-se por dar prioridade a projetos que proponham a investigação de famílias com vários membros afetados. Por isto, foi proposto o Projeto “ESTUDO DE DOENÇAS HEREDITÁRIAS EM MINAS GERAIS – Estabelecimento de uma Rede para Diagnóstico, Acompanhamento e Aconselhamento Genético” pelo Programa de Pesquisa para o SUS/FAPEMIG - que visa investigação de doenças degenerativas e/ ou metabólicas do sistema nervoso e ocular, em que um número expressivo de pessoas possa vir a se beneficiar do diagnóstico, acompanhamento e aconselhamento genético. Esse projeto também busca iniciar no estado de Minas Gerais um mapeamento da distribuição de afecções genéticas específicas.

Um dos objetivos do projeto é justamente a descentralização de atendimentos médicos com especialidade em genética. Para tanto, é realizado um trabalho conjunto do Internato Rural da Escola de Medicina da UFMG, com especialistas de outros departamentos dessa mesma Escola, com o ICB e o SUS formando uma rede de conhecimentos que levam as informações (diagnóstico clínico e molecular, acompanhamento, tratamento e aconselhamento genético) para toda a comunidade local que vive e, de certa forma, sofre com a família dos afetados. Também há uma contribuição com o mapeamento dessas doenças no estado de Minas Gerais

Dentre as doenças genéticas degenerativas propostas no projeto, a Síndrome de Allan-Herndon-Dudley foi trabalhada como um dos subprojetos.

A Síndrome de Allan-Herndon-Dudley (AHDS - *Allan-Herndon-Dudley Syndrome*, OMIM #300523) foi descrita em 1944 pelos geneticistas americanos William Allan, Nash Herndon, e seu colaborador, Florence Dudley. Orientaram a descrição clínica inicial da AHDS (ALLAN *et al.*, 1944) identificando como principais sintomas a hipotonia (fraqueza e incapacidade para manter a postura firme da cabeça), hipoplasia muscular (atrofia dos músculos do tronco e membros) e retardo no desenvolvimento mental, face longa e fina, contraturas articulares e hiporeflexia sendo que somente hipotonia e deterioração cognitiva severa estão presentes em 100% dos pacientes. Salientaram que a maioria dos pacientes aprendem a andar, mas com um porte desajeitado e inábil. A maioria consegue se comunicar, pronunciar palavras com esforço e grande dificuldade (murmuração e desordem). O controle

das atividades fecais e urinárias é tardia na infância e as vezes imperfeita quando adulto (JANSEN *et al.*, 2007).

As manifestações clínicas podem ser percebidas ainda no recém nascido do sexo masculino, sob forma de fraqueza muscular ou hipotonia e aos 6 meses incapacidade de manutenção da postura da cabeça, evoluindo para um quadro de retardo no desenvolvimento e prossegue, culminando com retardo mental severo, atrofia muscular, podendo levar a morte precoce.

A síndrome de Allan-Herndon-Dudley (AHDS) é uma rara desordem causada por mutação no gene que codifica o transportador de monocarboxilato 8 (*MCT8*), localizado no cromossomo X (Xq13.2). A doença é herdada de forma recessiva ligada ao X e possui penetrância completa, expressividade variável atingindo somente homens hemizigóticos com mutação, filhos de mulheres portadoras de mutação no *MCT8* (MULLER *et al.*, 2002).

AHDS é uma condição de retardo mental ligado ao X, sendo assim, a imensa maioria dos portadores do sexo masculino irão apresentar manifestações clínicas. A frequência da AHDS entre a população geral com retardo mental (RM) é difícil de ser estimada. Até o momento, estima-se uma frequência de 1/10.000 homens com RM (SCHWARTZ, 2005). Cabe aqui ressaltar a existência de um caso de paciente do sexo feminino apresentando fenótipo da doença devido a perda da expressão ocasionada pela quebra do gene *MCT8* por uma translocação balanceada t(X;9)(q13.2;p24) combinada com uma inativação não randômica do X desfavorável (FRINTS, 2008).

Dependendo da localização da mutação no gene *MCT8* observa-se diferentes graus de acometimento biofísico, uma vez que promove a não funcionalidade ou a funcionalidade parcial variando entre a quase normalidade e a ausência de transporte de HT.

O gene *MCT8*, agora *SLC16A2* (*solute carrier family 16, member 2*) foi primeiramente identificado por Lafreniere *et al.*, que mostrou a localização na região proximal do braço longo do cromossomo X (Xq13.2) (1994). Por causa da presença de um domínio PEST N-terminal consistindo de resíduos de Prolina (P), Glutamato (E), Serina (S), e Treonina (T), constituído de repetições de prolina/ácido glutâmico, bem como de 12 domínios transmembrana (TMD) hidrofóbicos e estar localizado no cromossomo X, o gene foi designado, anteriormente, XPCT (“X-linked PEST containing transporter”).

O gene *MCT8* cobre aproximadamente 112.6 kb de DNA genômico. Entretanto, o transcrito possui somente 4,3 kb de comprimento e contém seis éxons (LAFRENIERE *et al.*, 1994).

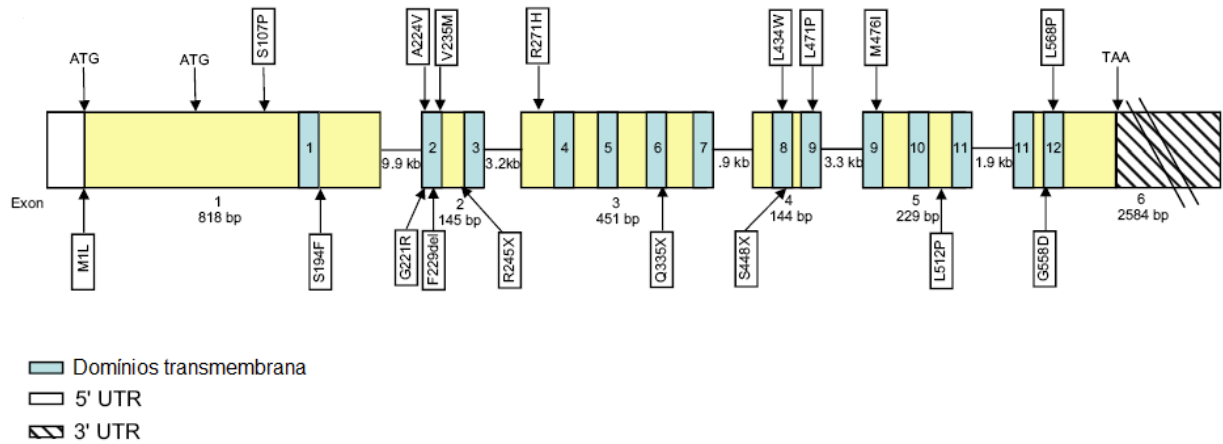


FIGURA 1 - Esquema da organização genômica do *MCT8/SLC16A2*. Os blocos retangulares indicam os seis éxons. Os retângulos numerados indicam a localização dos 12 domínios transmembrana dentro da sequência codificante. ATG, sítio de iniciação transcrricional, TAA, sítio de parada da transcrição. Nas caixas de texto auxiliares visualizamos algumas mutações identificadas no gene *MCT8* e abaixo das linhas indicação do número aproximado de pares de bases que constituem os íntrons.

Fonte: SCHWARTZ *et al.*, 2007, p. 310.

O primeiro éxon é relativamente longo (818bp) e tem dois sítios de iniciação alternativos (TLS – *translation Start Site*). Como resultado, o gene *MCT8* codifica duas proteínas potenciais, de 613 e 539 aminoácidos, respectivamente (Figura 1) (SCHWARTZ *et al.*, 2007). No camundongo, o gene *Slc16a2* possui somente o segundo TLS. Abaixo do segundo TLS, ocorre homologia entre os h*SLC16A2* das espécies humana e camundongo (JANSEN *et al.*, 2005). Ambas as proteínas codificadas contêm 12 supostos TMD (domínio transmembrana) sendo o menor deles altamente conservado em poucas espécies, com ambos, N- e C- domínios terminais localizados intracelularmente (HALPEN *et al.*; 1991; LAFRENIERE *et al.*, 1994). Os 12 TMD são dispostos através dos seis éxons, embora no éxon 3 existam sequências nucleotídicas para codificar quatro TMD e os TMD 9 e 11 são codificados por porções de dois diferentes éxons (éxon 4 e 5 para o TMD 9 e éxon 5 e 6 para o TMD 11) (SCHWARTZ *et al.*, 2007) (Figura 1).

A *MCT8* mostra uma grande distribuição em tecidos nas espécies mais estudadas camundongos e humanos. Estudos têm sido realizados em modelos animais que elucidam algumas dúvidas básicas. O mRNA do *MCT8* é altamente transcrito no fígado, rins, pituitária e tireóide, de modelos animais (camundongos) como demonstrado por hibridação histoquímica *in situ* (ISH) (FRIESEMA *et al.*, 2006).

Estudos ISH demonstraram diferenças entre a expressão da MCT8 em várias regiões do cérebro do camundongo (HEUER *et al.*, 2005). Altos níveis de transcrito são encontrados no plexo coróide no terceiro, quarto ventrículos e ventrículo lateral, e no interior das áreas neo e alo cortical (exemplo: bulbo olfatório, córtex cerebral, hipocampo e amígdala). Estudos de co-localização indicaram a predominância neural da MCT8.

Estudos imunohistoquímicos revelaram expressão da MCT8 no hipotálamo humano, notadamente nos neurônios paraventriculares (PVN), no núcleo supra-óptico e infundibular, e em linhagens de células endimais do terceiro ventrículo (ALKEMADE *et al.*, 2005). Estas localizações são envolvidas no *feedback* negativo do HT sobre o TRH (hormônio liberador de tireotrofina) hipotalâmico.

A quantidade de transcrito do gene *MCT8* e sua proteína estão significativamente aumentados na placenta humana durante a gestação (CHAN *et al.*, 2006). No início do terceiro trimestre de gravidez, os níveis de mRNA *MCT8* estão significativamente mais altos nas placentas associadas a restrição de crescimento intra-uterino que em placentas de gravidez normal. Isto pode refletir o mecanismo compensatório na tentativa de aumentar a absorção de HT.

A regulação do *MCT8* tem sido pouco estudada. A hibridação *in situ* hipotalâmica de *MCT8* em indivíduos com hipertireoidismo foi normal, sugerindo que o *MCT8* não está sendo modulado pelo HT (ALKEMADE *et al.*, 2005). Isto é suportado por estudos no camundongo *knockout* modelo *Pax8*^{-/-}; mostrando que a expressão da *MCT8* no cérebro não é afetada por hipotireoidismo congênito severo neste animal modelo (HEUER *et al.*, 2005). O papel do domínio PEST permanece ainda a ser investigado, particularmente na conformação da proteína *MCT8*.

Quase uma década após a identificação, o primeiro artigo sobre a função da *MCT8* surgiu, quando Friesema *et al.* (2003) descreveram (r)*MCT8* (*MCT8* de ratos) como sendo um transportador de hormônios tireoidianos (HT) específico e ativo. Oócitos de uma rã da espécie *Xenopus laevis*, injetados com cRNA do (r)*MCT8* mostraram uma grande indução no transporte de iodotironinas T4, T3, rT3 e T2. A especificidade da ligação foi demonstrada pela falta de transporte de T4 sulfamato, T4 sulfonato, os monocarboxilatos lactatos e neutros de cadeia ramificada (Leu) e aminoácido aromáticos (Phe, Tyr e Trp). A especificidade para iodotironinas foi confirmada pelos menores efeitos inibitórios de ácidos aromáticos no transporte de T4 e T3. O transporte de T4 mostrou uma modesta dependência de Na⁺, enquanto o transporte de T3 foi Na⁺ independente.

Friesema *et al.* reportou recentemente a caracterização funcional do hMCT8 (2006). Tomando o segundo TLS como códon de iniciação, o hMCT8 foi clonado por RT-PCR do isolado de RNA de células do fígado adulto humano e introduzido em um vetor de expressão. Células COS1 e JEG3, sendo que COS1 possuía a expressão endógena da MCT8 e JEG3 sem expressão endógena da MCT8, foram temporariamente transfectadas com hRNA do hMCT8. Após incubação com diferentes iodotironinas, ambas as linhagens celulares mostraram marcada estimulação de absorção de iodotironinas, com ligação preferencial de T3 > T4 > rT3 ~ T2. Subsequentemente foi demonstrado que hMCT8 provém de células com iodotironinas para metabolismo intracelular por diferentes deiodinases. Por exemplo, incubação de células não transfectadas com T3 não resulta em metabolismo significativo do hormônio, e transfecção com mRNA do hMCT8 ou D3 somente, leva a um modesto aumento do metabolismo do T3. Entretanto, a cotransfecção de mRNA do hMCT8 e D3 aumenta drasticamente o metabolismo de T3.

A observação de que a incubação de células capazes de expressar a MCT8 com T3 levam a uma rápida fase de estabilidade (*platô*), sugeriu um equilíbrio rápido entre influxo e efluxo do T3. Mensurações diretas do efluxo de T3 internalizado demonstraram rápida liberação do hormônio através da MCT8. Para investigar melhor, células foram cotransfectadas com hCRYM, uma proteína citosólica com alta afinidade para iodotironinas com preferência para T3>T4>rT3. A expressão da hCRYM leva ao aumento da capacidade de retenção intracelular do HT ligante (SUZUKI *et al.*, 2003; VIE *et al.*, 1997). Estudos de incubação com células capazes de expressar a proteína CRYM demonstraram significativa diminuição do efluxo de T3 pelo MCT8, com aumento na acumulação intracelular do hormônio (FRIESEMA *et al.*, 2006). Assim, a hMCT8 facilita tanto o influxo como o efluxo do T3.

No cérebro, os neurônios são o principal alvo de ação do T3. O suprimento de T3 é regulado localmente através da cooperação entre astrócitos e neurônios (Figura 2).

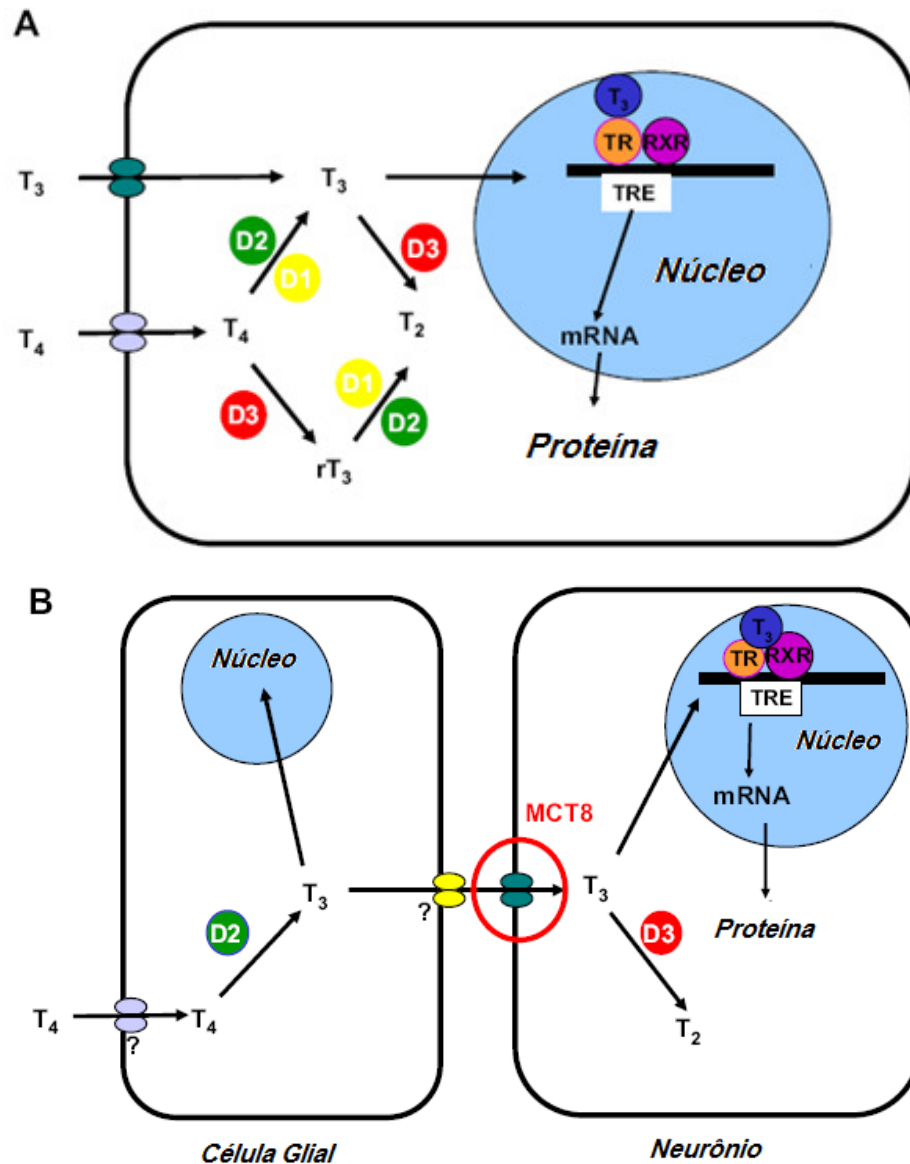


FIGURA 2 - (A) Representação esquemática do transportador de hormônio tireoidiano e deiodinação na célula alvo. Ambos T₃ e T₄ entram na célula e são alvos da ação das deiodinases. A forma ativa, T₃, entra no núcleo onde se liga a um receptor que então ativa a síntese de RNA mensageiros codificante para proteína específica. D1 é predominantemente expressa no fígado, rim, e tireóide; D2 no cérebro, pituitária anterior, músculo esquelético e tireóide. (B) Representação esquemática da fonte e transporte de T₃ no cérebro. T₄ entra nas células gliais via mecanismo desconhecido, e é convertido para T₃ pela D2. T₃ sai da célula via mecanismo desconhecido e é transportado para o interior do neurônio via MCT8. Uma vez dentro do neurônio, ele então entra para o núcleo, ligando-se a receptores que iniciarão a síntese de proteínas, ou é inativado pelo T₂ pela D3. D1, D2, D3, deiodinases; RXR, receptor retinóico ligado ao X; T₄, T₃ hormônios tireoidianos; TR, receptor de hormônio tireoidiano; TRE, elemento responsivo ao hormônio tireoidiano. ? mecanismo de transporte/exportação desconhecido.

Fonte: Schwartz, Stevenson, 2007, p. 308.

Esta hipótese de regulação local do T3 baseada na localização de diferentes processos por ISH (*in situ hybridization histochemistry* – hibridação histoquímica *in situ*), e envolvendo um número de passos conforme segue: (1) T4 (e algumas vezes extensivo ao T3) tem que atravessar a barreira hematoencefálica via transportadores ainda desconhecidos. (2) T4 é capturado por astrócitos via outro transportador desconhecido. (3) Uma vez dentro da célula, T4 é convertido para T3 através da ação da D2. No cérebro, D2 é predominantemente expressada no interior de astrócitos (GUADANO-FERRAZ *et al.*, 1997; ALKEMADE *et al.*, 2005). (4) Efluxo de T3 dos astrócitos são mediados por transportadores de hormônios tireoidianos desconhecidos. (5) Absorção de T3 em (um subconjunto de) neurônios é facilitada pela MCT8. No interior das células neuronais, T3 liga-se a receptores nucleares e exerce sobre eles funções de gene-modulação. Finalmente, o T3 é convertido por D3, que é expresso no interior dos neurônios (ALKEMADE *et al.*, 2005; TU *et al.*, 1999) (Figura 2). Na linha deste modelo, a inativação do *MCT8* resulta em um suprimento prejudicado de T3 para os neurônios. Considerando o importante papel do HT no crescimento neuronal, mielinização e até excitabilidade, é compreensível que a deficiência neuronal de T3 leve a fenótipos neurológicos severos (JONES *et al.*, 2005).

Dois diferentes camundongos *knockout MCT8* (K0) foram gerados para elucidar o mecanismo envolvido na patogênese do retardo psicomotor, fêmeas homozigotas nulas (*Mct8*^{-/-}) e machos (*Mct8*^{-/y}) (DUMITRESCU *et al.*, 2006; TRAJKOVIC *et al.*, 2007). O camundongo K0 (*Mct8*^{-/-}) apresenta características fenotípicas humanas como aumento dos níveis séricos de T3 e TSH, e decréscimo dos níveis de T4 comparado com seu tipo selvagem. Após injeção de T3 radioativo, nenhuma diferença entre camundongos K0 e tipo selvagem foi percebida em T3 séricos e na absorção do fígado, entretanto o camundongo K0 mostrou uma drástica redução na absorção de T3 no cérebro.

A metabolização do hormônio T3 no CNS (Sistema nervoso central) é regulada por deiodinases locais, chamadas deiodinases tipo II (D2) em astrócitos que converte T4 em T3 por deiodinação do anel externo, e deiodinase tipo 3 (D3) em neurônios que inativa T4 para reverso T3 (rT3) por deiodinação do anel interno.

Mutações presentes no gene *MCT8* podem levar a uma deficiência funcional, à capacidade residual de transporte com reduzida afinidade ao substrato e até mesmo manifestar a perda funcional total do transportador (*stop códon* prematuro ou degradação rápida) (JANSEN *et al.*, 2008).

Até o presente momento foram identificadas 43 mutações no gene *MCT8* (Friesema *et al.*, 2010), elas estão distribuídas no gene sem nenhuma região de concentração evidente. Mutações presentes no *MCT8* são variáveis, desde mutações de sentido trocado e sem sentido até deleções de um único par de bases, de um códon, um éxon inteiro, e até vários exons simultaneamente. Existem também inserções de um códon, assim como de um único nucleotídeo resultando em mudança na fase de leitura e produção de proteínas truncadas. A maioria delas, 58%, são mutações de sentido trocado e dentre todas as mutações pontuais, 76% são transições. Mutações de sentido trocado podem resultar na completa perda da função de transportador do gene *MCT8*, seja devido a reduzida expressão da proteína, seja pelo tráfego prejudicado através da membrana plasmática ou pela reduzida afinidade ao substrato. Além disso, todas as mutações no gene *MCT8*, com estudos realizados, resultam em ausência parcial ou total da atividade transportadora da proteína. Friesema *et al.* (2010) fizeram um compilado das mutações presentes no gene *MCT8* que segue na tabela 1. Todos os pacientes herdaram a mutação de suas mães, não sendo citados casos de mutações novas.

Hormônios tireoidianos desenvolvem um papel crucial em processos como migração de células neurais, autocrescimento dendrítico, formação de sinapses e mielinização (BERNAL, 2005). Neurônios são as principais células alvo para o hormônio tireóideo, expressando receptores de T3 (LEONARD *et al.*, 1994), D3 e MCT8 (HEUER *et al.*, 2005). Mutações com perda de função no *MCT8* levam a redução ou ausência de suprimento de T3 para os neurônios, resultando em desenvolvimento neurológico prejudicado bem como reduzido clearance de T3 pelo D3 neuronal (DUMITRESCU *et al.*, 2006).

A estreita regulação espaço-temporal do HT durante o desenvolvimento do cérebro é controlada por unidades funcionais de astrócitos e neurônios locais. Concentrações locais muito baixas ou muito altas podem causar uma sinalização anormal do HT resultando num desenvolvimento anormal do cérebro. Salienta-se aqui o papel desenvolvido no cérebro pela proteína MCT8: a proteína MCT8 está implicada na diferenciação das células tronco embrionárias em células neurais (SUGIURA *et al.*, 2007).

O diagnóstico de AHDS é essencialmente clínico, baseado na anamnese e história clínica do paciente com auxílio diagnóstico de ensaios bioquímicos de quantificação do nível sérico de hormônios tireoidianos (TSH, T3 e T4).

TABELA 1

Visão geral das mutações no gene *MCT8* de pacientes com AHDS (2004-2009)

Mutação		Efeito sobre o <i>hMCT8</i>	Referência
Nucleotídeo	Proteína		
(1-252,553)-(652 + 83,793)Del	delEx1	Predita inativação completa	Visser <i>et al.</i> (2009)
(1-9338)-(652 + 14,538)del	delEx1	Predita inativação completa	Friesema <i>et al.</i> (2004)
	delEx1	Predita inativação completa	Raymond <i>et al.</i> (2008)
	delEx2-4	Predita inativação completa	Vaurs-Barriere <i>et al.</i> (2009)
971-(1392 + 1008)Del	delEx3-5	Predita inativação completa	Friesema <i>et al.</i> (2004), Visser <i>et al.</i> (2009)
	delEx2-6	Predita inativação completa	Unpublished
	delEx6	Predita inativação completa	Raymond <i>et al.</i> (2008)
1A > T	M1L	N/A (<i>hMCT8L</i>)	Frints <i>et al.</i> (2008)
127insGGCAGC	insGS43	N/A (<i>hMCT8L</i>)	Wood <i>et al.</i> (2008)
565insATC	insI189	Inativação completa	Holden <i>et al.</i> (2005), Jansen <i>et al.</i> (2008)
575A >G	H192R	Não testada	Vaurs-Barriere <i>et al.</i> (2009)
581C > T	S194F	De parcial a completa inativação	Schwartz <i>et al.</i> (2005), Jansen <i>et al.</i> (2008), Kinne <i>et al.</i> (2009a)
630insA	N210fsX30	Predita inativação completa	Frints <i>et al.</i> (2008)
630insG	N210fsX30	Predita inativação completa	de Menezes-Filho <i>et al.</i> (2009)
631-644del	R211fsX25	Inativação completa predita	Jansen <i>et al.</i> (2007)
661G >A	G221R	Inativação completa	Schwartz <i>et al.</i> (2005), Vaurs-Barriere <i>et al.</i> (2009), Friesema <i>et al.</i> (2009)
670G >A	A224T	Não testada	Raymond <i>et al.</i> (2008)
671C > T	A224V	Inativação completa	Friesema <i>et al.</i> (2004), Jansen <i>et al.</i> (2008)
689-691delTCT	delF230	Inativação completa	Jansen <i>et al.</i> (2007), Schwartz <i>et al.</i> (2005)
703G >A	V235M	Inativação completa	Jansen <i>et al.</i> (2008), Schwartz <i>et al.</i> (2005)
706insGTG	insV236	De parcial a completa inativação	Kakinuma <i>et al.</i> (2005), Friesema <i>et al.</i> (2009), Kinne <i>et al.</i> (2009a)
733C > T	R245X	Inativação completa	Friesema <i>et al.</i> (2004), Jansen <i>et al.</i> (2008)
798-1G > C	del267-370	Inativação completa	Jansen <i>et al.</i> (2007)
812G >A	R271H	Inativação parcial	Jansen <i>et al.</i> (2007), Raymond <i>et al.</i> (2008), Kinne <i>et al.</i> (2009a)
844G > T	G282C	Inativação parcial	Wood <i>et al.</i> (2008), Friesema <i>et al.</i> (2009)
962C > T	P321L	Inativação completa	Vaurs-Barriere <i>et al.</i> (2009)
1003C > T	Q335X	Inativação completa predita	Herzovich <i>et al.</i> (2007), Vaurs-Barriere <i>et al.</i> (2009)
1018delC	L340X	Predita inativação completa	Raymond <i>et al.</i> (2008)
1201G >A	G401R	Não testada	Namba <i>et al.</i> (2009)
1212delT	A405fsX12	Predita inativação completa	Dumitrescu <i>et al.</i> (2004)
1301T >G	L434W	de parcial a completa inativação	Schwartz <i>et al.</i> (2005), Jansen <i>et al.</i> (2008), Kinne <i>et al.</i> (2009a)
1333C > T	R445C	Não testada	Vaurs-Barriere <i>et al.</i> (2009)
1343C >A	S448X	Inativação completa	Jansen <i>et al.</i> (2008), Schwartz <i>et al.</i> (2005)
1343-1344insGCCC	S448fsX5	Inativação completa predita	Mariotti <i>et al.</i> (2009)
1358A > T	D453V	Inativação completa	Friesema <i>et al.</i> (2009)
1412T > C	L471P	Inativação completa	Friesema <i>et al.</i> (2004) Jansen <i>et al.</i> (2008)
1500-1502delCTT	delF501	Inativação parcial	Visser <i>et al.</i> (2009)
1535T > C	L512P	Inativação completa	Dumitrescu <i>et al.</i> (2004)
1558C > T	Q520X	Predita inativação completa	Vaurs-Barriere <i>et al.</i> (2009)
1560insCACAA	Q520fsX73	Predita inativação completa	Unpublished
1610C > T	P537L	Inativação completa	Papadimitriou <i>et al.</i> (2008), Friesema <i>et al.</i> (2009)
1649delA	Y550fsX17	Predita inativação completa	Namba <i>et al.</i> (2009)
1673G >A	G558D	Inativação parcial	Frints <i>et al.</i> (2008), Friesema <i>et al.</i> (2009)
1690G >A	G564R	Inativação completa	Visser <i>et al.</i> (2009)
1703T > C	L568P	Inativação parcial	Jansen <i>et al.</i> (2008), Schwartz <i>et al.</i> (2005)
1826delC	P609fsX70	Não testada	Vaurs-Barriere <i>et al.</i> (2009)
1835delC	P612fsX68	Inativação parcial	Maranduba <i>et al.</i> (2006)

N/A = não avaliada

Fonte: Friesema *et al.*, 2010, p. 3.

Diagnosticado dois aspectos básicos da doença procede-se ao diagnóstico bioquímico, com mensuração dos níveis de TSH, LT3 e LT4. A presença de altos níveis séricos de T3 livre e baixos níveis de T4 livre e na maioria dos casos TSH normal ou no limite superior da quantificação normal, poderia ser um forte indicador de AHDS e da presença da mutação no *MCT8* (HEUER *et al.*, 2007).

O recente desenvolvimento de modelos animais de *MCT8* contendo mutações nulas (TRAJKOVIC *et al.*, 2007) tem ajudado na compreensão do mecanismo fisiopatológico para testes anormais de função tireóidea. A reduzida entrada de T4 no interior das células do cérebro estimula a atividade das D2. Entretanto, o excesso de HT no fígado reflete a absorção celular de T3 através de transportadores diferentes da *MCT8* e estimula a atividade da D1 nos hepatócitos. Isto resulta na formação de quantidade maior de T3 e maior consumo de T4 no fígado. A reduzida ou inexistente absorção de T3 em órgãos de expressão da proteína *MCT8* mutante acentua o acúmulo de T3 sérico, pois não havendo transporte do mesmo para o interior das células, não ocorrerá metabolização pelas deiodinases. Os níveis baixos de rT3 são explicados pelo aumento do metabolismo de rT3 devido ao aumento da atividade da D1 e o consumo do T4.

Imagens de Ressonância Magnética do Crânio podem evidenciar extensivo retardo na mielinização e alta intensidade de sinais do globo pálido. Durante uma crítica janela de desenvolvimento, o hormônio tireoidiano induz a diversas formas de sinais de diferenciação e maturação que levam a estabelecer o circuito neural. Este processo inclui neurogênese, migração de células neurais (ocorrendo predominantemente entre 5 e 24 semanas), diferenciação neuronal, crescimento dendríticos e axonais, sinaptogêneses, gliogêneses (do período fetal até 6 meses pós-parto), mielinização (segundo trimestre a 24 meses pós-parto), e síntese de enzimas neuro-transmissoras. A ausência de hormônio tireoidiano durante este período parece apontar para um retardo em algum grau pois, elimina eventos morfológicos críticos ou expressão de genes, resultando em desordem na comunicação intercelular (BROWN *et al.*, 2005).

Espectroscopia por Ressonância Magnética pode demonstrar aumento na concentração de lactado no córtex cerebral e substância branca em crianças de até 2 anos podendo ser utilizado como exame auxiliar no diagnóstico da AHDS.

Surdez é raramente documentada em AHDS, indicando que o sistema neurosensorial não depende completamente da *MCT8* para o transporte do HT. Certamente,

um outro suposto transportador de HT, o OATP1C1, um membro da família dos polipeptídios transportadores de ácidos orgânicos (OATP), é expresso na cóclea (FRIESEMA *et al.*, 2005).

No tangente a expressão do *MCT8*, em todos os casos reportados de AHDS, estão ausentes manifestações de hipotiroidismo global, quadro que seria justificado pela não funcionalidade da *MCT8*, e consequente deficiência de HT no interior das células/tecidos. A ausência de manifestações de hipotiroidismo indica que órgãos/células utilizam outros transportadores como a família OATP para a absorção de HT (ABE *et al.*, 2002; FRIESEMA *et al.*, 2005; PIZZAGALLI *et al.*, 2002; SUGIYAMA *et al.*, 2003). Por outro lado, a ausência de hipotiroidismo sugere que transportadores numerosos e redundantes, incluindo a *MCT8*, desempenham papéis distintos na fina sintonia órgão/células específicos do HT. Além dos mais, estudos complementares são necessários para dissecar completamente a fisiologia do transportador, para entendermos o metabolismo e regulação do HT e dos transportadores do mesmo.

O tratamento de paciente AHDS tem sido feito com suplementação de L-T4 (Levotiroxina) sem sucesso (DUMITRESCU *et al.*, 2004). Os pacientes AHDS também demonstraram a presença de ambas as disfunções “hipertiroidismo” e “hipotiroidismo” a nível sistêmico em tecidos diferentes. O hipertiroidismo é observado nos ossos, músculo esquelético e fígado, e hipotiroidismo nos neurônios (HERZOVICH *et al.*, 2006). As duas formas (hipertiroidismo e hipotiroidismo) coexistem mesmo diante dos altos níveis de T3 circulante devido a distribuição diferencial dos transportadores de hormônio tireoidiano nos órgãos do corpo. O hipotiroidismo (falta de T3) nos neurônios ocorre devido a ineficiência da proteína *MCT8* na absorção de HT. Na tentativa de tratar os neurônios “hipotiróidicos”, aumentando os níveis de T3 circulante, a disponibilidade de T3 sérico irá afetar os tecidos que possuem transportadores alternativos de HT (OATP, LAT, NTCP) predispostos à condição de “hipertiroidismo” pela eficiência que estes possuem na absorção de HT, acumulando T3 no interior da célula, a níveis tóxicos. Na última década, diferentes grupos de transportadores têm sido identificados com atividade sobre os HT (ABE *et al.*, 2002; FRIESEMA *et al.*, 2005). Dentre esses, incluem o polipeptídeo cotransportador de Na⁺-taurocholate (Na⁺-*taurocholate cotransporting polypeptide* -NTCP) (FRIESEMA *et al.*, 1999), diferentes membros da família dos polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos Na⁺-independente (Na⁺-*independent organic anion transporting polypeptide* -OATP) (HAGENBUCH *et al.*, 2007), dentre outros.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

A dissertação teve como objetivo geral a identificação da mutação causadora da Síndrome de Allan-Herndon-Dudley tendo como gene candidato, o gene *MCT8*.

2.2 Objetivos Específicos

Amplificar as regiões codificadoras e de sítios de recomposição dos éxons do gene candidato, *MCT8*, através da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR).

Sequenciar os amplicons obtidos.

Identificar e analisar possíveis mutações existentes nos éxons do gene candidato.

Correlacionar os genótipos com os fenótipos diagnosticados clinicamente de cada indivíduo buscando relacionar a penetrância e a expressividade na família.

Gerar a sequência primária de aminoácidos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

3.1.1 O Probando

O probando do presente estudo, aqui chamado BCNS (18-12-2002) atualmente, possui 7 anos e é acompanhado pela equipe do Hospital das Clínicas de Belo Horizonte (MG, Brasil) desde os seus 1 ano e 11 meses de idade, com diagnóstico de Síndrome de Allan-Herndon-Dudley, com manifestações de hipotonia congênita, hipoplasia muscular e atraso no desenvolvimento psicomotor.

BCNS é produto de segunda gestação materna, sem problemas no pré-natal. Nasceu de parto normal, a termo, peso do nascimento 3.650 g, comprimento 51 cm, perímetro cefálico 35 cm. T4 neonatal normal. Aos 2 meses notou-se a incapacidade de manutenção da postura da cabeça. Com 5 anos e 9 meses, não sentava sem apoio, pronunciava poucas palavras e sem articulação clara. Apresentava peso de 14,5 kg, estatura de 114 cm e perímetro cefálico de 51 cm, observando-se um parâmetro de idade e peso de 3 anos (perda muscular) e idade e estatura de 5 anos e 9 meses (normal) ficando claro o quadro de retardo do desenvolvimento.

Foram realizadas uma tomografia computadorizada de encéfalo e uma ressonância magnética nuclear em outubro de 2003, onde ambos os laudos com afirmação de normalidade.

Em junho de 2007 foram realizadas dosagens de hormônios tireoidianos, com T3 igual a 148 ng/dl (valor de referência de 105 a 269 ng/dl); TSH 0,539 μ UI/mL (valor de referência de 0,8 a 1,9 μ UI/mL); FT4: 1,24 ng/dL (valor de referência 0,7 a 6,4 ng/dL).

Em dezembro de 2007 foi realizada a ressonância magnética cefálica, sendo emitido um laudo afirmando espectroscopia normal.

3.1.2 História familiar.

A mãe do probando nasceu em 1981 e o pai em 1971, sendo a idade da concepção 21 e 31 anos respectivamente. Segundo o histórico familiar da mãe, a mesma possui dois irmãos afetados com características clínicas similares, nascidos em 1981 e 1983. O mais velho (CNR) apresentava-se hipotônico desde os 3 meses de idade, nunca andou nem sentou sozinho, porém consegue se alimentar sozinho. Pronuncia palavras pouco compreensíveis, tem controle de fezes e urina. O mais novo (WNR) é hipotônico e com pescoço mole desde os 35 dias de vida. Sua tomografia computadorizada de crânio aos 21 anos não apresentou alterações. Possui escoliose importantíssima. Não fala, tem retardo mental evidente e mantém bom contato visual. O irmão da avó materna faleceu com o mesmo quadro sintomático. Uma irmã da avó materna também teve um filho falecido aos 13 anos com o mesmo quadro clínico e, a outra irmã da avó materna tem dois filhos doentes, um nascido em 1976 e o outro em 1987.

Em 2005 nasceu o irmão do probando, sendo uma criança com quadro clínico normal, evoluindo sadio.

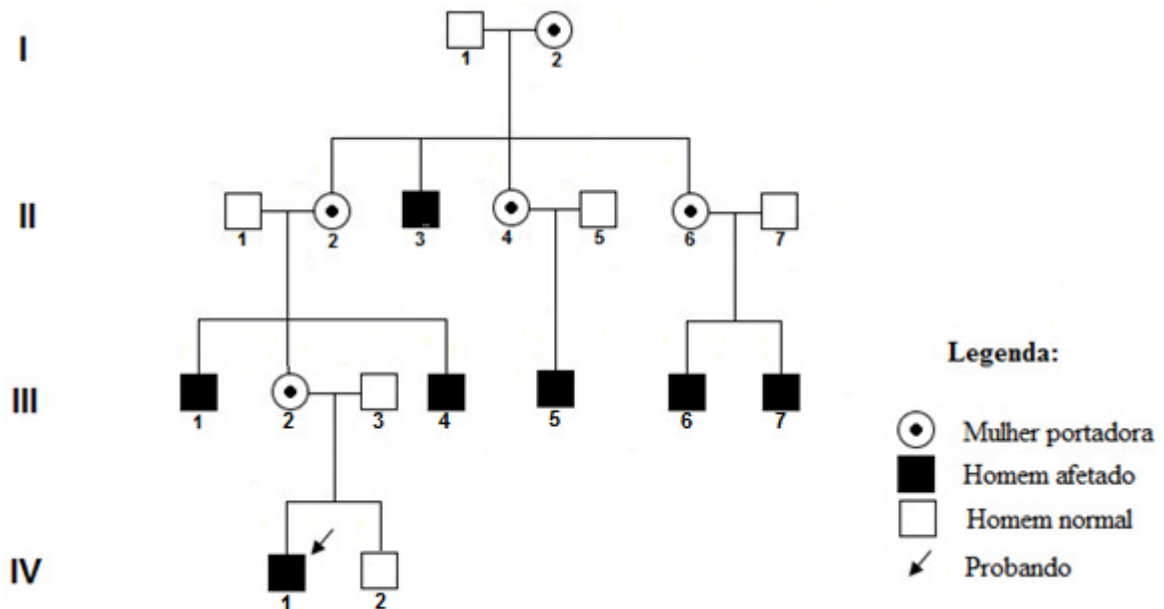


FIGURA 3 - Heredograma da família estudada com todos seus membros. Identificação dos indivíduos pertencentes ao grupo familiar acompanhado com as iniciais dos nomes próprios: IV.1 – BCNS; III.1 – CNR; III.2 – MENS; III.4 – WNR; II.2 – MDG

Fonte: Hospital das Clínicas da UFMG.

3.1.3 Pacientes

O primeiro passo desse estudo foi um encontro com os membros da família acometida pela AHDS com o objetivo de apresentá-los a doença, o estudo e esclarecer dúvidas, sendo esta tarefa foi desempenhada pelo Ambulatório de Doenças Metabólicas do Hospital das Clínicas da UFMG. Foi realizada uma coleta de sangue (10 mL), após autorização obtida com a assinatura do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (ETIC 337/06).

Participaram do estudo 5 pessoas da família, sendo 3 do sexo masculino (IV.1; III.1; III.4) e 2 do sexo feminino (III.2; II.2) conforme Figura 3.

3.2 Amostra estudada

Foi utilizado DNA genômico purificado resultado da extração de sangue obtido por punção venosa a vácuo dos pacientes-alvo da família a ser estudada.

3.3 Genotipagem

O DNA genômico foi extraído do sangue periférico segundo protocolo no qual se utiliza Proteinase K (20 mg/mL) e tampão de lise (Tris HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 2 mM; pH 8,2 e SDS 10%). Em seguida, foi lavado em etanol 70% e diluído em solução de TE (MILLER *et al.*, 1988). A concentração do DNA extraído foi quantificada por espectrofotometria de massa sob comprimento de onda de 260nm.

A concentração de DNA e a razão 260/280nm nas soluções obtidas após a extração foram determinadas por análise espectrofotométrica no aparelho WPA UV 1101 Biotech photometer utilizando-se comprimento de onda de 260 nm e o quociente 260nm/280nm, respectivamente, obtendo-se das amostras, um quociente compreendido entre 1,86 a 1,94. As amostras estoque foram diluídas à concentração de 100 ng/μL e armazenadas a -20 °C.

Primeiramente, os éxons do gene *MCT8*, incluindo as junções de recomposição, foram amplificados a partir do DNA genômico extraído utilizando-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para obter os primers utilizados nos experimentos, foi usado como referência o artigo com os primers descritos: Schwartz *et al.*, 2005. Foram feitas

tentativas de amplificação do éxon 1 com primer não constante no artigo, sendo desenhados seis pares de primers a partir de programas de livre acesso, Primer 3, v.0.4.0. (ROZEN; SKALETSKY, 2007)¹ e NetPrimer².

A sequência do gene *MCT8* foi utilizada como parâmetro informacional da sequência referência necessária ao desenho dos primers, que flanqueiam as regiões alvo a ser amplificada pela reação em cadeia de polimerase, e posterior sequenciamento do amplicons obtidos. A sequência referência foi obtida no banco de dados genômicos do Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>).

Os primers dos éxons 2, 3, 4, 5 e 6 foram retirados do artigo “*Allan-Herndon-Dudley Syndrome and the Monocarboxylate Transporter 8 (MCT8) Gene*” (SCHWARTZ, 2005). Porém os primers do éxon 1 da sequência publicada não amplificaram sobre nenhuma condição testada usando a Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen), e procedeu-se assim, ao desenho de novos primers, que não foram eficientes. Como tentativa final foi usada outra taq, GoTaq™ DNA Polymerase (Promega), que amplificou o éxon 1 usando os primers do artigo. Os primers utilizados na amplificação estão ilustrados a seguir na tabela 2 segue com as sequência nucleotídica constantes nos primers senso (S) e antisense (A) dos éxons investigados. Segue em anexo tabela 4 constando de sequência nucleotídica dos éxons do gene *MCT8 (SLC16A2)* com regiões intrônicas, exônicas e marcação simbólica dos primers e sua localização, facilitando a visualização dos amplicons resultante de ampliações de segmentos de DNA genômico.

A qualidade dos iniciadores foi testada na tentativa de maximizar a qualidade da amplificação, evitando a formação de fragmentos espúrios que pudessem prejudicar a realização do sequenciamento dentro dos parâmetros aceitáveis de qualidade, tais como intensidade e distanciamento adequado dos picos e minimização de ruídos. Os iniciadores foram testados individualmente e em pares quanto à formação de hairpins, presença de regiões internas repetidas, formação de homodímeros, heterodímeros, crossdímeros e tiveram as temperaturas de anelamento checadas com o programa NetPrimer³.

¹ [www.http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3)

² <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>

³ www.premierbiosoft.com/netprimer

Os iniciadores foram sintetizados pela PRODIMOL e submetidos a desbloqueio, dessalinização, liofilização e tiveram qualidade avaliada por espectrometria de massa. Os primers liofilizados foram diluídos em água milli-Q na concentração estoque de 50 pmol/μL.

TABELA 2

Relação de sequências nucleotídicas utilizadas como primers nas amplificações por PCR

Éxons	Rótulo	Sequência	Tamanho do Produto	T(°C)
ÉXON 1	1 S	5'-CGGCTGCCTGTTGAGGGAGGAAGA-3'	773 pb	64
	1 A	5'-GCAGCGGGAGCGGCCAACCTT-3'		
ÉXON 2	2 S	5'-CCAGCAGTACCACCAGGCACTACA-3'	310 pb	64
	2 A	5'-CAT GGC CAC AGG GGA TTC TGC-3'		
ÉXON 3	3 S	5'-AAGGGCGGAGGAATGGAAGTCTCA-3'	632 pb	65
	3 A	5'-CCCACCCCCACCCTCTGGAATCTA-3'		
ÉXON 4	4 S	5'-GCCAAGGGATAAGCAGCCAGAG-3'	417 pb	57
	4 A	5'-CATGCGACACAACAAGCTACCATT-3'		
ÉXON 5	5 S	5'-CCCCTCCCACCACCCCATTT-3'	411 pb	64
	5 A	5'-GGAGTGCCAGTACCCAGGGAAAAA-3'		
ÉXON 6	6 S	5'-ACGGGCTGAGAGTACCTTTGGACA-3'	395 pb	61
	6 A	5'-GTGCGCAGGTCTGGGAACAAGTG-3'		

Fonte: CHARLES et al., 1995, p. 49 (Adaptada).

Nota: Dados trabalhados pelo autor

Foram realizadas 42 reações de PCR, incluindo todas as variações de concentração de íons cloreto, quantidade de Taq Polimerase, temperatura. A amplificação das regiões de interesse foi realizada pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e foi adotado um protocolo padrão (AUSUBEL *et al.*, 1995), utilizado em nosso laboratório com modificações, para as concentrações e quantidades dos reagentes necessários por reação de volume definido como 50 μL com a Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen): 31,2 μL de H₂O Milli-Q autoclavada; 5 μL de tampão PCR 10x sem cloreto (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 40 mM NaCl, 2 mM Fosfato de sódio, 0.1 mM de EDTA, 1 mM de DTT, estabilizantes, 50% (v/v) glicerol) (Invitrogen); 1 μL de mix dNTP (dATP + dGTP + dTTP + dCTP) 10mM (Invitrogen); 1,5 μL de solução de MgCl₂ 50mM (Invitrogen); 0,5 μL de primer senso e 0,5 μL de primer antisenso a 10pmol/μL; 0,3 μL de Platinum® Taq DNA Polimerase 5U/μL (Invitrogen) e 10 μL de DNA a 5 ng/ μL.

Na amplificação pela GoTaq® Green Master Mix, utilizou-se o seguinte protocolo com as concentrações e quantidades dos reagentes necessários por reação de volume definido

como 50 μL : 25 μL (1x) de GoTaq® Master Mix (2X); 5.0 μL de primer senso (10 pmol/ μL); 5,0 μL de primer antisenso (10 pmol/ μL); 10 μL de DNA a 5 ng/ μL ; e completar com H₂O Milli-Q autoclavada para o volume final de 50 μL .

Para otimizar a amplificação dos iniciadores, foram necessárias algumas adaptações do protocolo de modo a aumentar a estringência da reação, permitindo a amplificação dos produtos específicos esperados e eliminação de fragmentos espúrios. Essas adaptações foram feitas após padronização das reações nas quais se utilizou DNA humano diluído dos indivíduos estudados, de modo a obter a proporção adequada de DNA na reação nas concentrações desejadas. Para amplificação do fragmento, utilizou-se volume de 0,5 μL de cada primer a 10pmol/ μL e 3 μL de MgCl₂ 50mM por reação; para amplificação dos demais fragmentos (2, 3, 4, 5, 6) utilizei o protocolo padrão para a reação de PCR.

Para a amplificação das sequências alvos do DNA genômico, foram utilizados os termocicladores automáticos MJ96+ e o termociclador de gradiente MJ96G da Biocycler.

O programa adotado para a amplificação com Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen) envolveu uma desnaturação inicial da dupla fita a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos envolvendo 3 etapas, 30 segundos a temperatura de 94°C, 1 minuto de anelamento dos iniciadores com temperaturas que variaram entre 57°C e 65°C (57°C para o fragmento 4, 64°C para os fragmentos 2 e 5, 65°C para o fragmento 3 e 61°C para o fragmento 6), e 1 minuto de extensão à 72°C. Uma etapa seguinte de 3 minutos foi destinada para uma extensão final das fitas a 72°C, para que seja completada a extensão homogênea de todos os amplicons resultantes. Após o término da reação, as amostras foram mantidas a 4°C até serem retiradas termociclador e guardadas na geladeira a 4°C para posterior visualização do produto em gel de agarose 1% por eletroforese, utilizando brometo de etídio. Já o programa adotado para a amplificação pela GoTaq® Green Master Mix (Promega) envolveu uma desnaturação inicial da dupla fita a 96°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos envolvendo 3 etapas, 45 segundos a temperatura de 96°C, 1 minuto de anelamento dos iniciadores com temperaturas que variaram entre 64°C para o fragmentos 1, 1 minuto de extensão à 72°C. Uma etapa seguinte de 3 minutos foi destinada para uma extensão final das fitas a 72°C, para que seja completada a extensão homogênea de todos os amplicons resultantes. Após o término da reação, as amostras foram mantidas a 4°C até serem retiradas termociclador e guardadas na geladeira a 4°C para posterior visualização do produto em gel de agarose 1% por eletroforese, utilizando brometo de etídio.

Foram realizadas 132 reações de seqüenciamento englobando reações que não foram obtidos sinais idéias para leitura e reações com sinais de intensidade e espaçamentos de picos aceitáveis.

O produto de PCR foi aplicado no gel de agarose 1% dissolvida em TBE (90 mM Tris; 90 mM ácido bórico; 2mM EDTA), corado com brometo de etídeo (concentração final de 10mg/mL). Após a montagem do gel nas cubas, e a deposição das amostras nos poços do gel, foi utilizada voltagem de 80 volts na formação de um campo elétrico homogêneo, por aproximadamente 55 minutos, propiciando a migração do DNA do ânodo (pólo negativo) para o cátodo (pólo positivo). Ao término do processo de eletroforese, as bandas estacionárias dos amplicons de DNA, de disposição avaliada com auxílio do padrão de peso molecular 100 pb (ladder) (Invitrogen), eram visualizados sob a incidência de luz ultravioleta em transluminador e comparadas com as posições de bandas resultantes da aplicação do padrão de peso molecular. A purificação dos amplicons gerados a partir do DNA dos pacientes foi feita através da excisão das bandas de interesse do gel de agarose e purificação utilizando o kit de purificação Wizard® SV gel and PCR clean-up System da Promega segundo orientações do fabricante.

A quantificação dos produtos de PCR purificados foi feita no Nanodrop® ND1000.

Para obtenção de fragmentos marcados com fluorescências a serem detectadas no sequenciador, utilizou-se o kit da Applied Biosystems, Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing, em uma reação de seqüenciamento no termociclador. A reação de seqüenciamento foi realizada segundo protocolo indicado pelo fabricante com algumas alterações. Reagentes (quantidade por reação): 1 µL de Big Dye v.3.1 com concentração padrão do kit; 1 µL de tampão de seqüenciamento 5x com concentração padrão do kit; 2 µL de primer a 0,8 pmol/µL ou 0,2 µL de primer a 10 pmol/µL; 2,5 µL 4 µL do produto de PCR, dependendo da quantificação do produto purificado, sendo que a concentração de DNA desejada em cada reação é de 20 ng, sendo o volume final da reação completado com água até 10µL.

O programa adotado para a amplificação diferencial com incorporação das fluorescências envolveu uma desnaturação inicial da dupla fita de DNA a 96°C por 3 minutos, seguido de 44 ciclos envolvendo 3 etapas, 30 segundos a temperatura de 96°C procedendo à desnaturação da dupla fita de DNA, 15 segundos de anelamento do iniciador (senso ou antisenso, somente um primer em cada reação) com fita única de DNA à temperatura de 50°C

e 4 minutos de extensão a 60°C. Uma etapa seguinte de resfriamento cessando as reações químicas à temperatura de 4°C, sendo mantidas nessa temperatura até a transferência para o freezer a -20°C.

Logo em seguida procedeu-se ao protocolo de precipitação Etanol/EDTA/Acetato de sódio proposto pela Applied Biosystems conforme sugestão do manual do Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, com algumas alterações: adição de 1 µL de EDTA 125mM aos 10 µL da amostra obtida após a reação de sequenciamento, 1 µL de acetato de sódio 3M e 25 µL de etanol 100%; homogeneização e manutenção a temperatura ambiente por 15 minutos; retirada do sobrenadante e adição de 35 µL de etanol 70%; centrifugação a 4°C, 4.500 rpm por 10 minutos; retirada do sobrenadante e secagem dos tubos *in natura*.

Procedeu-se ao sequenciamento no aparelho ABI PRISM 3130 - 1 x *capillary sequencer* (Applied Biosystems), com sequenciamento das fitas senso e não-senso.

A análise dos eletroferogramas obtidos do sequenciamento foi feita utilizando o programa *Codon Code Aligner v.2.0.6. DEMO*.

4 RESULTADOS

4.1 Análise dos amplicons

Os amplicons obtidos (figura 4) continham a região exônica completa, exceto os amplicons dos éxons 1 e 6. No éxon 1, parte da região 5' UTR foi excluída e no éxon 6 parte da região 3' UTR foi excluída devido a impossibilidade do desenho de primers específicos para regiões que os englobassem. A região 5' UTR por ser rica em GC, inviabilizou sua amplificação por falta da especificidade necessária e não alcançada no desenho dos iniciadores. Foram feitas duas tentativas de desenho de *primers* para o éxon 1 incluindo a região 5'UTR, mas não houve especificidade na amplificação sob várias condições testadas, temperatura, concentração de íons Cl⁻ e concentração de *primers* sendo que foram realizadas 15 PCR em termociclador de gradiente de temperatura. Foi feita também uma tentativa de amplificação da região 3' UTR junto ao éxon 6, porém sem especificidade e gerou um *amplicon* com tamanho muito grande para o sequenciamento completo, aproximadamente 2800 pb.

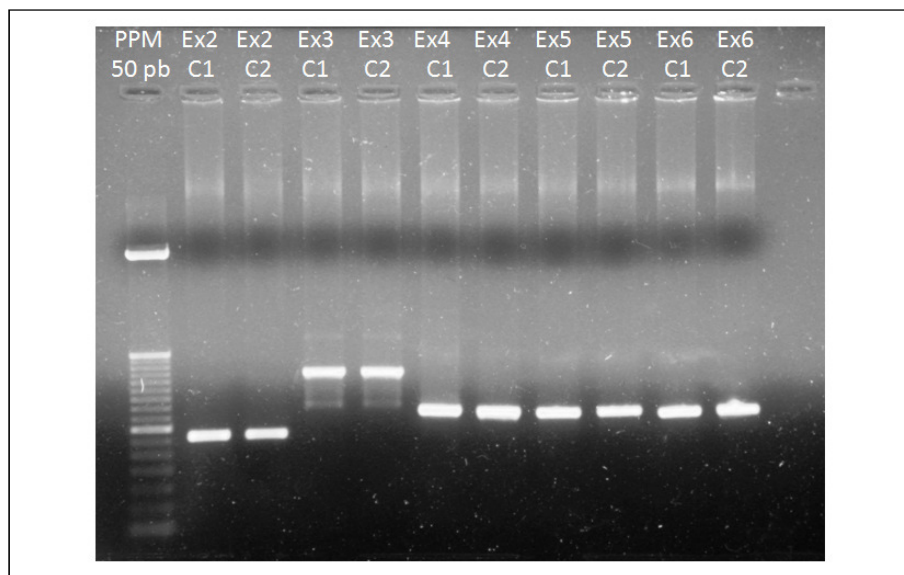


FIGURA 4 - Fotografia da padronização da amplificação do éxon 2 (Ex2), éxon 3 (Ex3), éxon 4 (Ex4), éxon 5 (Ex5) e éxon 6 (Ex6) do gene *MCT8* humano. PPM – padrão de peso molecular; C1 – DNA controle 1; C2– DNA controle 2.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.2 Análise de eletroferogramas

Todos os 6 éxons foram analisados. Não foram encontradas mutações nem SNPs. Os sequenciamentos senso e antisenso realizados a partir de DNA genômico purificado dos 5 membros da família, controles negativos e sequência referência tiveram coincidência de sequência, não obtendo o padrão esperado de heterozigosidade das mulheres portadoras e de homozigosidade dos homens afetados pela doença proposta no diagnóstico clínico.

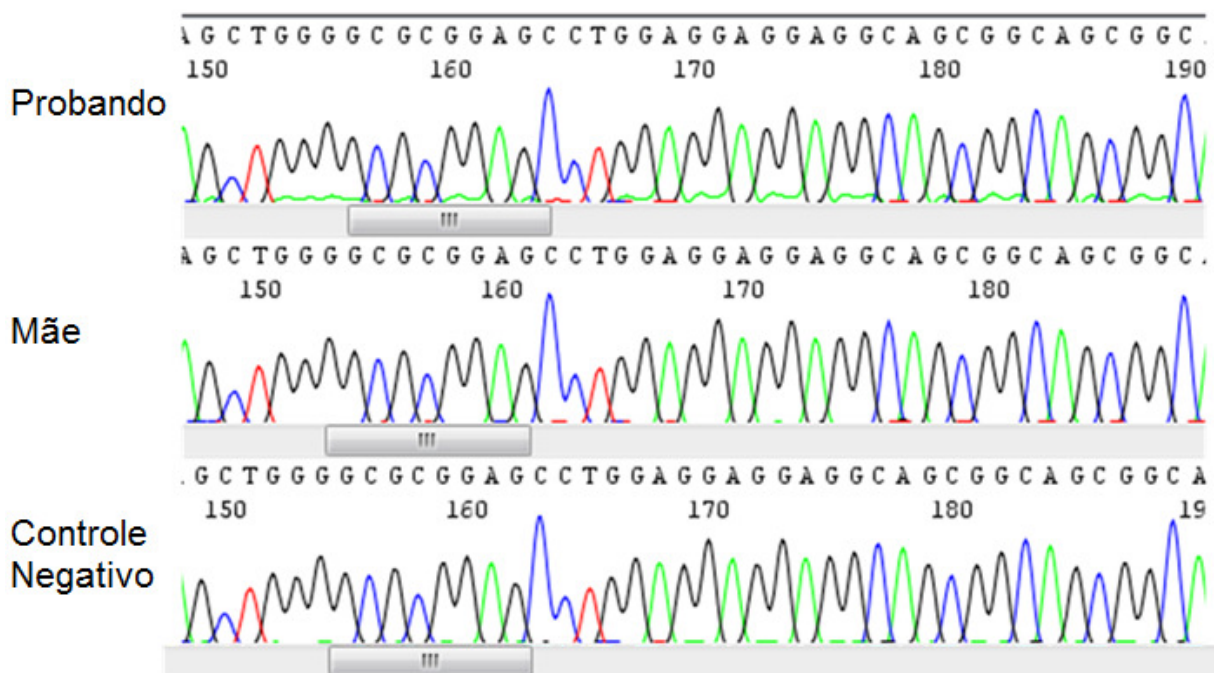


FIGURA 5 - Eletroferogramas exibido no software CodonCodeAligner após o sequenciamento de amplicons do éxon 1 do probando, sua mãe e controle negativo, com alinhamento para verificação de discrepâncias na sequência de bases nitrogenadas.

Fonte: Codon Code Aligner v.2.0.6.

Através de análise dos eletroferogramas (figura 5) não foi evidenciada mutação em nenhum dos amplicons dos éxons de 1 a 6 sequenciados.

4.3 Alinhamento

O passo seguinte ao sequenciamento foi a realização do alinhamento das sequências geradas a partir dos amplicons dos éxons de 1 a 6, dos pacientes e controle negativo, com a sequência consenso extraída do banco de dados *Ensembl Genome Browser*. Através desta análise, não foi possível detectar qualquer alteração nucleotídica entre as sequências provenientes dos indivíduos da família analisada com aquela depositada no banco de dados (Figura 6).

```

Paciente 1 'GGCCCAAGCAGCCACAGTCCCCCGCCGCGATGGCGCTGCAAAGCCAGGCGAGCGAGGAAGCAAAGGGG
Paciente 2 'GGCCCAAGCAGCCACAGTCCCCCGCCGCGATGGCGCTGCAAAGCCAGGCGAGCGAGGAAGCAAAGGGG
Controle N 'GGCCCAAGCAGCCACAGTCCCCCGCCGCGATGGCGCTGCAAAGCCAGGCGAGCGAGGAAGCAAAGGGG

Contig      'GGCCCAAGCAGCCACAGTCCCCCGCCGCGATGGCGCTGCAAAGCCAGGCGAGCGAGGAAGCAAAGGGG
Seq. Ref.   'GGCCCAAGCAGCCACAGTCCCCCGCCGCGATGGCGCTGCAAAGCCAGGCGAGCGAGGAAGCAAAGGGG

```

Legenda:

Paciente 1 - Probando
Paciente 2 - Mãe do probando
Controle N - Controle negativo

FIGURA 6 - Resultado de alinhamento de sequência exibido pelo *software* CodonCodeAligner. A figura ilustra o resultado do sequenciamento de parte do éxon 1 e seu alinhamento com a sequência referência (Seq. Ref.), extraída do banco de dados *Ensembl Genome Browser*, gerando uma sequência consenso resultado do alinhamento das mesmas (Contig). Neste sequenciamento não foi possível detectar qualquer alteração nas sequências apresentadas.

Fonte: Codon Code Aligner v.2.0.6. DEMO.

5 DISCUSSÃO

Diante da não identificação de uma mutação nas regiões exônicas, faz-se necessário a investigação das regiões não seqüenciadas (5' e 3' UTR). Para a realização do sequenciamento da região 5' UTR do éxon 1, uma alternativa seria a utilização de polimerases resistentes a temperaturas superiores a 94°C de ativação enzimática, para que as ligações por pontes de hidrogênio estabelecidas entre as bases Guanina e Citosina sejam quebradas com maior eficiência nas regiões GC repetitivas, facilitando a amplificação. Já na região 3'UTR do éxon 6, o desenho dos *primers* deverá abranger regiões que propiciem condições ideais de anelamento, delimitando amplicons com o tamanho necessário a inclusão das regiões UTR (~2800 pb). Para que os amplicons finais não excedam 1000 pb, que é o tamanho ideal para o sequenciamento, é sugerido aqui um *semi-nested*, amplificando sub-regiões com primers internos, reduzindo o tamanho das seqüências obtidas no final do processo. Tais sugestões emanam da análise dos resultados e da consciência da necessidade de mais tempo para que todas as hipóteses aqui levantadas fossem elucidadas, diante dos resultados obtidos.

Ciente do resultado obtido, a não identificação de alterações na seqüência de bases nitrogenadas dos amplicons dos éxons 1, 2, 3, 4, 5, e 6 do gene *MCT8*, foi feita uma abordagem genética mais ampla no sentido de considerar eventos mutacionais em outras regiões do gene que pudessem corroborar o diagnóstico clínico da AHDS. Mutações em regiões UTR, promotoras ou intrônicas com ação no processo transcricional, de recomposição, ou traducional, podem determinar a formação do fenótipo da AHDS, via mecanismos de interação molecular.

Não foi encontrada nenhuma referência bibliográfica sobre possíveis mecanismos de ação de mutações determinantes na formação do fenótipo da AHDS, via mecanismos de interação molecular, possivelmente em função da não existência de estudos voltados para processos alternativos, de mutações em promotores, de interação de transcritos de íntrons e da existência de pequenos RNAs não-codificantes interagindo na expressão gênica.

Por outro lado, a modulação da expressão gênica por pequenos RNAs não-codificantes é uma descoberta recente de regulação da transcrição em animais, tendo sido implicados em vários aspectos do desenvolvimento animal, como o neural, muscular e desenvolvimento de linhagens germinativas. A idéia tradicional da expressão gênica relegou ao RNA um papel de certo modo subsidiário, reservando a maioria das funções regulatórias para proteínas. Não obstante, em 1961, Jacob e Monod propuseram que RNAs poderiam

inibir a expressão de operons por pareamento de bases com a sequência do operador (JACOB, MONOD, 1961). Aliando esses conhecimentos à recente descoberta de que 74% de todos os genes humanos possuem transcrição dentro de seus íntrons (NAKAYA *et al.*, 2007) podemos levantar a hipótese da existência de mutação na região intrônica do gene *MCT8* que teria implicação na transcrição do gene e conseqüentemente na sua tradução, o que geraria o fenótipo descrito nos pacientes com AHDS aqui estudados. Merece então, a região intrônica, uma atenção no sentido de busca de regiões candidatas à localização da mutação no gene *MCT8*, que confirme o diagnóstico clínico dos membros acometidos na família estudada.

Na análise dos dados constantes no prontuário médico do probando BCNS, foi encontrado o registro de uma tomografia computadorizada de encéfalo (TCE) aos 5 anos de idade com laudo afirmando espectroscopia normal. Em pesquisa literária específica, encontrou-se relatos de alterações anatômicas cerebrais devido a retardo na mielinização e neurogênese, em um probando AHDS com sintomatologia semelhante à do nosso paciente. Aos 2 anos, sua tomografia computadorizada do encéfalo mostrou extensivo retardo na mielinização e alta intensidade de sinal do globo palidus, devido a mutação no gene *MCT8* (c.1649delA) (NAMBA *et al.*, 2008). Entretanto, a ausência de anomalias anatômicas na TCE do probando BCNS é pouco expressiva diante da variabilidade fenotípica encontrada nos dados clínicos de diferentes pacientes acometidos com AHDS.

Durante uma crítica janela de desenvolvimento, o hormônio tireoidiano induz a diversas formas de sinais de diferenciação e maturação que estabelecem o circuito neural. Este processo inclui neurogêneses, migração de células neurais (ocorrendo predominantemente entre 5 e 24 semanas de gestação), diferenciação neuronal, crescimento dendríticos e axonais, sinaptogêneses, gliogêneses (do estágio fetal avançado para 6 meses após o pós-parto), mielinização (segundo trimestre a 24 meses pós-parto), e síntese de enzimas neurotransmissoras. A ausência de hormônio tireoidiano durante este tempo parece apontar para um retardo em algum grau levando a eliminar eventos morfológicos críticos ou expressão de genes, resultando em desordem na comunicação intercelular (BROWN; LARSEN, 2005). Essa desordem pode ser traduzida em formações anatômicas encefálicas discrepantes das consideradas formas normais. Dito isso, é necessário ainda salientar que não é obrigatória a presença dessas anormalidades fenotípicas no encéfalo para que o diagnóstico da Síndrome de Allan-Herndon-Dudley seja confirmada. Variações fenotípicas são observadas em pacientes cuja mutação ocupe uma posição diferente em regiões funcionais do

gene *MCT8*. Variações fenotípicas são observadas em pacientes cuja mutação ocupe uma posição diferente em regiões funcionais do gene *MCT8*.

Foram realizados exames bioquímicos constando de dosagens hormonais, T3, T4, LT4, e TSH. Todos com dosagem dentro dos parâmetros de normalidade ou no caso do TSH ligeiramente abaixo do normal. Cabe aqui um comentário relevante no que tange às discrepâncias quantitativas hormonais frequentes em síndromicos da AHDS. Testes de função tireoidiana que apresentam elevados níveis de LT3 e baixos níveis de LT4 na presença de secreção de tireotrofinas (TSH) com valores próximos ao limite superior da dosagem admissível dentro dos padrões de quantificação, são indicativos de AHDS. Entretanto, diferentes estudos com portadores de mutações diferentes no gene *MCT8*, tem indicado para um consenso sobre a existência da distorção na dosagem de LT3 (FRIESEMA *et al.*, 2004, NAMBA *et al.*, MARANDUBA *et al.*, 2006). Uma possível explicação para o fato é que o transporte de HT através da barreira hematocefálica acontece continuamente, o T4 e T3 (em menor quantidade) será absorvido pelos astrócitos, que metabolizarão o T4 convertendo-o a T3 pela ação da D2. Após liberação do T3 pelos astrócitos, deveria ser absorvido pelos neurônios, porém não haverá absorção, uma vez que os neurônios não possuem a proteína transportadora *MCT8* funcional, ou as possuem com comprometimento na eficiência do transporte, variando com o tipo e posição da mutação. Os valores de T3, T4, LT4 e TSH são variáveis dentro do fenótipo da AHDS, não constituindo um parâmetro de inclusão ou exclusão sendo que em diferentes mutações encontramos variações significativas na dosagem dos mesmos.

Os parâmetros determinantes na caracterização da sintomatologia do AHDS consistem na mensuração dos níveis hormonais de LT3, LT4 e rT3 (FRIESEMA *et al.*, 2010). BCNS, aos 5 anos, realizou dosagens hormonais de T3, FT4 e TSH, obtendo resultados normais para as duas primeiras dosagens e abaixo do normal para o TSH. Estes resultados são possíveis dentro do quadro clínico descrito para síndromicos da AHDS. A dosagem de TSH acima dos parâmetros bioquímicos normais evidenciada em casos de AHDS relaciona-se a um fenômeno ainda pouco estudado e compreendido da fisiopatologia. Não foi possível ainda contar com informações bioquímicas importantes, dosagem de FT3 e rT3, uma vez, da ausência dos exames bioquímicos supracitados para reforçar a hipótese de AHDS.

Na busca por dados que reforçassem o diagnóstico clínico e delineasse com mais nitidez o quadro situacional, foi elaborada a tabela 3 onde fica clara a comparação entre a sintomatologia de pacientes com AHDS e as apresentadas pelo probando BCNS.

TABELA 3

Comparação entre a sintomatologia de pacientes com AHDS e do Probrando

Pacientes AHDS	X	Probrando
<input checked="" type="checkbox"/> Hipotonia; <input checked="" type="checkbox"/> Hiporeflexia; <input checked="" type="checkbox"/> Retardo mental severo; <input checked="" type="checkbox"/> hipoplasia muscular; <input checked="" type="checkbox"/> Retardo no desenvolvimento; <input checked="" type="checkbox"/> Pronuncia de palavras com esforço e dificuldade <input checked="" type="checkbox"/> ↑LT3, ↓LT4, ↑↔TSH <input checked="" type="checkbox"/> Imagem de ressonância magnética = normal ou com ligeira atrofia cortical, com hipomielinização;		<input checked="" type="checkbox"/> atraso no desenvolvimento psicomotor. <input checked="" type="checkbox"/> Incapacidade de manutenção da postura da cabeça (hipotonia congênita). <input checked="" type="checkbox"/> Com 5 anos e 9 meses, incapacidade de manter postura. <input checked="" type="checkbox"/> idade e peso abaixo do normal (hipoplasia muscular) <input checked="" type="checkbox"/> Dosagem T3, LT4, normais e TSH abaixo do normal, aos 5 anos. <input checked="" type="checkbox"/> Ressonancia magnética cefálica normal <input checked="" type="checkbox"/> Tomografia computadorizada de encéfalo normal

Fonte: Dados do autor

A tabela 3 vale-se das descrições sintomáticas do probando e da doença ligada ao sexo eleita como mais provável, a Síndrome de Allan-Herndon-Dudley. A comparação demonstrou coincidência entre vários aspectos sintomatológicos.

6 CONCLUSÃO

Embora não tenha sido encontrado qualquer alteração nucleotídica (mutação) nos éxons e regiões adjacentes (junções), evidenciada pelo sequenciamento das regiões exônicas e pequenas adjacências intrônicas do gene *MCT8* ou mesmo com a falta de evidências bioquímicas e/ou físicas detectadas por imagens, permanecem evidências de retardo mental ligado ao X, visualizada pela história familiar, apoiado pela sintomatologia do probando, que aos 5 anos e 9 meses, data da última consulta, manifestava hipotonia, hipoplasia muscular, retardo mental grave e movimentos atetóides, indicando como hipótese mais provável o diagnóstico clínico como Síndrome de Allan-Herndon-Dudley.

Sugere-se aqui um estudo complementar com sequenciamento das regiões UTR 5' e 3', região do promotor, e investigação de transcritos intrônicos que possam interagir na recomposição dos éxons do gene *MCT8* para a total elucidação do possível processo molecular responsável pelas manifestações fenotípicas observadas na família estudada.

REFERÊNCIAS

ABE, T.; SUZUKI, T.; UNNO M.; TOKUI, T.; ITO, S. Thyroid hormone transporters: recent advances. *Trends Endocrinol Metab*, v.13, p.215–220, Jul. 2002.

ALKEMADE, A.; FRIESEMA, E. C.; UNMEHOPA, U. A.; FABRIEK, B. O.; JUIPER, G. G.; LEONARD, J. L.; WIERSING, W. M.; SWAAB, D. F.; VISSER, T. J.; FLIERS, E. Neuroanatomical pathways for thyroid hormone feedback in the human hypothalamus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 90, p. 4322– 4334, 2005.

ALLAN, W.; HERNDON, C.N.; DUDLEY, F. C. *et al.* Some examples of the inheritance of mental deficiency: apparently sex-linked idiocy and microcephaly. *American Journal of Mental Deficiency*, v. 48, p. 325–334, Washington, 1944.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. *Short Protocols in Molecular Biology*. ed. JohnWiley and Sons, v. 4, p. 732, Chichester, 1995.

BERNAL, J. Thyroid hormones and brain development. *Vitam Horm*, v.71, p. 95–122, 2005.

BROCKMANN, K.; DUMITRESCU, A. M.; BEST, T.T.; HANEFELD, F.; REFETOFF, S. X-linked paroxysmal dyskinesia and severe global retardation caused by defective MCT8 gene. *J Neurol*, v.252, p. 663–666, 2005.

BROWN, R.; LARSEN, P. R. Thyroid gland development and disease In infants and children. In: <http://WWW.THYROIDMANAGER.ORG> website, version of February 28 , 2005.

CHAN, S. Y.; FRANKLYN, J. A.; PEMBERTON, H.N. *et al.* Monocarboxylate transporter 8 expression in the human placenta: the effects of severe intrauterine growth restriction. *Journal of Endocrinology*, v. 189, p. 465– 471, 2006.

DUMITRESCU, A. M. , LIAO, X. H.; WEISS, R. E.; MILLEN, K.; REFETOFF, S. Tissue-specific thyroid hormone deprivation and excess in monocarboxylate transporter (mct) 8-deficient mice. *Endocrinology*, v. 147, p. 4036–4043, 2006.

DUMITRESCU, A. M.; LIAO, X. H.; BEST, T. B. *et al.* A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *American Journal of Human Genetics*, v. 74, p. 168–175, 2004.

FRIESEMA, E. C. H. *et al.* Genetics and phenomics of thyroid hormone transport by MCT8. *Molecular and Cellular Endocrinology, Rev.*, p. 1-7, 2010.

FRIESEMA, E. C.; GANGULY, S.; ABDALLA, A. *et al.* Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 40126–40135, 2003.

FRIESEMA, E. C.; GANGULY, S.; ABDALLA, A.; MANNING FOX, J. E.; HALESTRAP, A. P.; VISSER, T. J. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem*, v. 278, p. 40128–40135, 2003.

FRIESEMA, E. C.; GRUETERS, A.; BIEBERMANN, H. *et al.* Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet*, v. 364, p.1435–1437, 2004.

FRIESEMA, E. C.; JANSEN, J.; HEUER, H. *et al.* Mechanisms of disease: psychomotor retardation and high T3 levels caused by mutations in monocarboxylate transporter 8. *Nature Clinical Practice, Endocrinology & Metabolism*, v. 2, p. 512–523, 2006.

FRIESEMA, E. C.; JANSEN, J.; VISSER, T. J. Thyroid hormone transporters. *Biochem Soc Trans*, v. 33, p. 228–232, 2005.

FRIESEMA, E. C.; KUIPER, G. G.; JANSEN, J. *et al.* Thyroid hormone transport by the human monocarboxylate transporter 8 and its rate-limiting role in intracellular metabolism. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, v. 20, p. 2761–2772, 2006.

FRIESEMA, E.C.; JACHTENBERG, J. W.; JANSEN, J. *et al.* Human monocarboxylate transporter 10 does transport thyroid hormone. *Thyroid*, v.16, p. 913, 2006.

GEREBEN, B.; ZAVACKI, A. M.; RIBICH, S.; KIM, B.W.; HUANG, S. A.; SIMONIDES, W. S.; ZEOLD, A.; BIANCO, A. C. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev*, v. 29, p.898–938, 2008.

GUADANO-FERRAZ, A.; OBREGON, M. J.; St GERMAIN D. L.; BERNAL, J. The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *PNAS*, v. 94, p. 10391–10396, 1997.

GUADANO-FERRAZ, A.; OBREGON, M. J.; St GERMANIN, D. L. *et al.* The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 94, p. 10391–10396, 1997.

HAGENBUCH, B. Cellular entry of thyroid hormones by organic anion transporting polypeptides. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 21, p 209–221, 2007.

HALESTRAP, A.P.; MEREDITH, D. The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch*, v. 447, p. 619–628, 2004.

HERZOVICH, V. *et al.* Unexpected peripheral markers of thyroid function in a patient with a novel mutation of the MCT8 thyroid hormone transporter gene. *Horm Res*, v. 67, p. 1-6, 2007

HERZOVICH, V. *et al.* Unexpected peripheral markers of thyroid function in a patient with a novel mutation of the MCT8 thyroid hormone transporter gene. *Horm Res*, v. 67, p.1–6, 2006.

HEUER, H.; MAIER, M. K., IDEN, S. *et al.* The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations. *Endocrinology*, v.146, p. 1701–1706, 2005

HEUER, H.; MAIER, M. K.; IDEN, S.; MITTAG, J.; FRIESEMA, E. C.; VISSER, T. J.; BAUER, K. The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations. *Endocrinology*, v.146, p.1701-1706, 2005.

HEUR, H. The importance of thyroid hormone transporters for brain development and function. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 21, p 265–276, 2007.

HOLDEN, K. R.; ZUNIGA, O. F.; MAY, M. M.; SU, H.; MOLINERO, M. R.; ROGERS, R. C.; SCHWARTZ, C. E. X-linked MCT8 gene mutations: characterization of the pediatric neurologic phenotype. *J Child Neurol*, v. 20, p. 852–857, 2005.

JACOB, F. & MONOD, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.*, v. 3, p. 318–356, 1961.

JANSEN J.; FRIESEMA, E.C.; MILICI, C. *et al.* Thyroid hormone transporters in health and disease. *Thyroid*, v.15, p. 757–768, 2005.

JANSEN, J.; FRIESEMA, E. C.; KESTER, M. H.; SCHWARTZ, C. E.; VISSER, T. J. Genotype-phenotype relationship in patients with mutations in thyroid hormone transporter MCT8. *Endocrinology* , v. 149, p. 2184–2190, 2008.

JANSEN, J.; FRIESEMA, E. C.; KESTER, M. H.; MILICI, C, REESER, M.; GRUTERS A.; BARRETT, T. G.; MANCILLA, E. E.; SVENSSON, J.; WEMEAU, J. L.; BUSI DA SILVA CANALLI M. H., LUNDGREN, J.; McENTAGART, ME, HOPPER, N.; ARTS, W. F.; VISSER, T. J. Functional analysis of monocarboxylate transporter 8 mutations identified in patients with X-linked psychomotor retardation and elevated serum triiodothyronine. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 92, p.2378–2381, 2007.

JONES S.A.; THOEMKE, K.R. & ANDERSON G.W. The role of thyroid hormone in fetal and neonatal brain development. *Current Opinion in Endocrinology Diabetes*, p. 10–16, 2005.

KAKINUMA, H.; ITOH, M.; TAKALASHI, H. A novel mutation in the monocarboxylate transporter 8 gene in a boy with putamen lesions and low freeT4 levels in freeT4 levels in cerebrospinal fluid. *J Pediatr*, v.147, p.552–554, 2005.

LAFRENIERE, R. G.; CARREL L & WILLARD H. F. A novel transmembrane transporter encoded by the XPCT gene in Xq13.2. *Human Molecular Genetics*,v.3, p. 1133–1139, 1994.

LAFRENIERE, R.G.; CARREL, L.; Willard, H.F. A novel transmembrane transporter encoded by the XPCT gene in Xq13.2. *Human Molecular Genetics*,v. 3, p. 1133–1139, 1994.

LEONARD, J. L.; FARWELL, A. P.; YEN, P.M.; CHIN, W. W.; STULA, M. Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms in neurons and astroglial cells. *Endocrinology*, v. 135, p.548–555, 1994.

MARANDUBA, C. M. C *et al.*, Decreased cellular uptake and metabolism in Allan-Herndon-Dudley syndrome (AHDS) due to a novel mutation in the MCT8 thyroid hormone transporter. *J. Med. Genet.*, v. 43, p. 457-460, 2006

MARTIN, J. P. & BELL J. A pedigree of mental defect showing sex linkage. *Journal of Neurology and Psychiatry*, v. 6, p.154–157, 1943.

MULLER, Y.; ROCCHI, E.; LAZARO, J. B.; CLOS, J. Thyroid hormone promotes BCL-2 expression and prevents apoptosis of early differentiating cerebellar granule neurons. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 13, p. 871–885, 1995.

NAKAYA, H. I.; AMARAL, P.P.; LOURO, R.; LOPES, A.; FACHEL, A. A. *et al.* Genome mapping and expression analyses of human intronic noncoding RNAs reveal tissue-specific patterns and enrichment in genes related to regulation of transcription. *Genome Biol*, v. 8, p. 8-R43, 2007.

NAMBA, N. *et al.* Clinical phenotype and endocrinological investigations in a patient with a mutation in the MCT8 thyroid hormone transporter. *Eur. J. Pediatr*, v.167, p. 785–791, 2008.

NAMBA, N.; ETANI, Y.; KITAOKA, T.; NAKAMOTO, Y.; NAKACHO, M.; BESSHO, K.; MIYOSHI, Y, MUSHIAKE, S.; MOHRI, .; ARAI, H.; TANAIKE, M.; OZONO, K. Clinical phenotype and endocrinological investigations in a patient with a mutation in the MCT8 thyroid hormone transporter. *Eur J Pediatr*, v. 167, p 785–791, 2008.

NISHIMURA, M.; NAITO, S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet*, v. 23, p. 22–44, 2008.

PIZZAGALLI, F.; HAGENBUCH, B.; STIEGER, B.; KLENK, U.; FOLKERS, G.; MEIER, P. J. Identification of novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter. *Mol Endocrinol*, v.16, p. 2283–2296, 2002.

PRICE, N. T.; JACKSON, V. N.; HALESTRAP, A. P. Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. *Biochem J*, v. 329(Pt 2), p. 321–328, 1998.

PRUMMEL, M. F.; BROKKEN, L. J. & WIERSINGA W. M. Ultra short-loop feedback control of thyrotropin secretion. *Thyroid*, v. 14, p 825–829, 2004.

REFETOFF, S.; DUMITRESCU, A. M. Syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone: genetic defects in hormone receptors, cell transporters and deiodination. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 21, p. 277–305, 2007.

RINTS, S. G.; LENZNER, S.; BAUTERS, M.; JENSEN, L. R.; VAN ESCH, H.; DESPORTES, V.; MOOG, U.; MACVILLE, M. V.; VAN ROOZENDAAL, K.; SCHRANDER-STUMPEL, C. T.; TZSCHACH, A.; MARYNEN, P.; FRYNS, J. P.; HAMEL, B.; VAN BOKHOVEN, H.; CHELLY, J.; BELDJORD, C.; TURNER, G.; GECZ, J.; MORAINÉ, C.; RAYNAUD, M.; ROPERS, H. H.; FROYEN, G.; KUSS, A. W. MCT8 mutation analysis and identification of the first female with Allan-Herndon-Dudley syndrome due to loss of MCT8 expression. *Eur J Hum Genet*, v.16, p.1029–1037, 2008.

ROBERTS, L. M.; WOODFORD, K.; ZHOU, M.; BLACK, D. S.; HAGGERTY, J. E.; TATE, E. H.; GRINDSTAFF, K. K.; MENGESHA, W.; RAMAN, C.; ZERANGUE, N.

Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier. *Endocrinology*, v.149, p.6251–6261, 2008.

ROZEN, S.; SAKALETSKY, H. *Primer 3*. [Cambridge, MA]: Whitehead Institute for Biomedical Research, 2007. Disponível em: < <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/> >. Acesso em: 29 jan. 2010.

SCHARWARTZ, C. E.; MAY, M. M.; CARPENTER, N. J. *et al.* Allan-Herndon-Dudley syndrome and the monocarboxylate transporter 8 (MCT8) gene. *American Journal of Human Genetics*, v. 77, p 41–53, 2005.

SCHARWARTZ, C. E.; STEVENSON, R. E. The MCT8 thyroid hormone transporter and Allan–Herndon–Dudley syndrome. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* , v. 21, n. 2, p. 307–321, 2007.

SCHWARTZ, C. Allan-Herndon-Dudley Syndrome. *Orphanet Encyclopedia*, Agosto, 2004.

SCHWARTZ, C. E.; STEVENSON, R. E. The MCT8 thyroid hormone transporter and Allan–Herndon–Dudley syndrome. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 21, p. 307–321, 2007.

SCHWARTZ, C.E. *et al.* Allan–Herndon–Dudley syndrome and the monocarboxylate transporter 8 (MCT8) gene. *Am. J. Hum. Genet*, v. 77, p. 41–53, 2005.

SUGIURA, M.; NAGAOKA, M.; YABUUCHI, H.; AKAIKE, T. Overexpression of MCT8 enhances the differentiation of ES cells into neural progenitors. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 360, p. 741–745, 2007.

SUGIYAMA, D.; KUSUHARA, H.; TANIGUCHI, H. *et al.* Functional characterization of rat brain-specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: high affinity transporter for thyroxine. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 43489–43495, 2003.

SUZUKI, S.; MORI, J.; KOBAYASHI, M. *et al.* Cell-specific expression of NADPH-dependent cytosolic 3,5,30- triiodo-L-thyronine-binding protein (p38CTBP). *European Journal of Endocrinology*, v.148, p 259–268, 2003.

TOHYAMA, K.; KUSUHARA, H. & SUGIYAMA, Y. Involvement of multispecific organic anion transporter, Oatp14 (Slc21a14), in the transport of thyroxine across the blood-brain barrier. *Endocrinology*, v.145, p. 4384– 4391, 2004.

TRAJKOVIC, M.; VISSER T. J.; MITTAG, J. *et al.* Abnormal thyroid hormone metabolism in mice lacking the monocarboxylate transporter 8. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 117, p. 627–635, 2007.

TU, H. M.; LEGRADI, G.; BARTHA, T. *et al.* Regional expression of the type 3 iodothyronine deiodinase Messenger ribonucleic acid in the rat central nervous system and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology*,v. 140, p. 784–790, 1999.

VAURS-BARRIÈRE, C.; DEVILLE, M.; SARRET, C.; GIRAUD, G.; DES PORTES, V.; PRATS-VINAS, J. M.; DE MICHELE, G.; DAN, B.; BRADY, A. F.; BOESPFLUG-TANGUY, O.; TOURAINE, R. Pelizaeus-Merzbacher-like disease presentation of MCT8 mutated males. *Ann Neurol*, in press

VIE, M. P.; EVRARD, C.; OSTY, J. *et al.* Purification, molecular cloning, and functional expression of the human nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-regulated thyroid hormone-binding protein. *Molecular Endocrinology* ,v.11, p. 1728–1736, Baltimore, 1997.

VISSER, W. E.; FRIESEMA, E.C.; JANSEN, J.; VIESSER, T. J. Thyroid hormone transport in and out of cells. *Trends Endocrinol Metab*, v. 19, p.50–56, 2008.

VISSER, W. E.; JANSEN, J.; FRIESEMA, E. C.; KESTER, M. H.; MANCILLA, E.; LUNDGREN, J.; VAN DER KNAAP, M. .; LUNSING, R. J.; BROUWER, O. F.; VISSER, T. J.; Novel pathogenic mechanism suggested by ex vivo analysis of MCT8 (SLC16A2) mutations. *Hum Mutat* , v.10, p.1002, 17 July 2008.

WILLIAMS, G. R. Neurodevelopmental and Neurophysiological Actions of Thyroid Hormone. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 20, p. 784–794, 2008.

ANEXOS

TABELA 4

Sequência nucleotídica dos éxons do gene *MCT8 (SLC16A2)* com regiões intrônicas, exônicas e marcação simbólica dos primers e sua localização.

Exon	Comprimento do Éxon (pb)	Comprimento do amplicon (pb)	Sequência
1	2.585	773	TCTAGAGCCTGCGGGGAAAAGAGGGCAGGAGAACAGGATAGTTTGTGC TTCCTTTTTTCCATTTTAACTTTTCTCTAACGGGCATCCGGGCAAGAAC A GGGTTCA GTAGTT TGGGAAGGGAGCTGGGGAGGCAGTGGCGGC TGGAGTAGGTAGGCGAGTAAAAGGAGGAGGAAGGGCTGGGGAGAA GAGCGAGGCTGTAGCGGCTGCCTGTTGAGGGAGGAAGAGGTGGGG GGTGTGGAGGAGGGGGAGGAGAGAGAGATGACATGGGGAGAGGA GGAGGGGGGTGGACGTGGGAGGAGGAGGAGAGGGCTCGAGGGA CCGTCTGTCGCGGGACGGGCTGGCCAGCTGGGGCGCGGAGCCTGG AGGAGGAGGCAGCGCAGCGGCAGCAGCAGCCCTCCGAGCAGCAG CAGCTGCAGCAGCAGAAACAAGTACCAGCCACAAAGCGGCTCCTCT GGCCCAAGCAGCCACAGTCCCCCGCCGATGGCGCTGCAAAGC CAGGCGAGCGAGGAAGCAAAGGGGCCCTGGCAGGAGGCAGACCAG GAACAGCAGGAGCCGGTGGGTAGCCAGAGCCGGAGTCTGAGCCG GAGCCTGAGCCCGAGCCCGAGCCCGTGCCAGTGCCCCGCCCCGAG CCCCAGCCGAGCCCCAGCCCCTACCGGACCCCGCACCCCTGCCG GAGCTGGAGTTTCGAGTCCGAGCGGGTGACGAACCCGAGCCCACG CCTACGGTAGAGACCCGCGGCACCGCGCGCGGCTTCCAGCCTCCC GAAGGTGGCTTCGGCTGGGTGGTGGTTCGCTGCCACCTGGTGA ACGGCTCCATCTTCGGCATCCATAACTCTGTGCGGGATCTCTACTCC ATGCTGCTAGAGGAGGAAAAGGAAAAAATCGCCAAGTGGAGTTCC AAGCAG GTGAGTGGCCCCGCACGCCCCACTTGGCATTTTGGGC AAGGT TGGCCGCTCCCGTGGC ACCAGACCCCATACCTCCGGTCCGAGGGCGCC CCTCCAACGCGCCTCTCCGACTCCTCCCCTTACCCCTTACCCCTTGCCCC TTGCCCCCTTCCATGGCTCTCC
2	229	310	CAATGCAATGCCCCCTGTGAAAGGCCAGAGAAGAAGAGCTGAGATA CC AGCAGTACCAACAGGCACTACA CTAAGCTAAAGTGCTTTGCACTTGT TTTCTCTGCAG CATGGGTCCGAGCCCTCCGATGGGTATGATCTTCT TCTGTTCTCCATTGTGAGTATATTA CTG ACC GT TTGGGCTGCCGA ATCACGAACCGCGGGGGCTGCCGTTGCTTTCATTGGCCCTCCATA CCAGCTCCTTACCAG GTAAGGCTAAGAGTTGGTGGTTATTTCCCAA GGCTGAGGGTTGGTTTTTTCTGGGCTTTAGCTAGGGTTACTTTTCTCAC TGCAGAATCCCTGTGGCCATG GCCCTGTAGGGCCCTCAAAGATCCTG CACCTGGATTAGAATCCA
3	144	632	CTTCTTTGTCTGTTCTGAGGGTCAGTGGCAAGTGGGGCTGTGGGTT AAG GGCGGAGGAATGGAAGTCTCA GGAAGCTGACAGGGGAGGGCAGGTA GATTGCTGGTCAGGCTGCTGAGGACAGCTCTTGGTATTTCTCCACAG C TCCCTAAGCCTGCGCTACTTACCTACGGGATTCTCTTGGTTGTGG CTGTTCTTCCCTTTCAGCCATCCCTCGTCATCCTGGGCCACTACT TTCAACGCGCCTGGGTCTGGCCAATGGTGTGGTGTCTGCTGGGAG TAGCATTCTCCATGTCCTTCCCCTTCCCTCATCAGAATGCTGGGGG ATAAGATCAAGCTGGCCCAAACCTTCCAGGTGCTGAGTACCTTCAT GTTTGTCTTATGCTGCTTTCACCTACCTACCGGCCCTCCTGCCCA GCTCCAGGACACCCCAAGCAAGAGAGGTGTCCGCACCCTGCACCA

Exon	Comprimento do Éxon (pb)	Comprimento do amplicon (pb)	Sequência
			<p>GCGCTTCTGGCTCAGCTCAGGAAGTACTTCAACATGCGAGTGTTCCGCCAACGCACTTACCGCATCTGGGCCTTCGGAATTGCTGCTGCTGCCCTGGCTACTTTGTTCCTATGTACACCTGGTGAGGAATACCAGAGTGGGCCACCCACCTGGCCCAAGAAGCTACCTCAACCTGCCTAGATTCCAGAGGGTGGGGTGGGAGACATTGAAAGGCAGAGCTGGGACCTTTGGGAAAAGAAACAAAATATTGGTTGGAGAGATCCAGAGAGGGAA A</p>
4	451	417	<p>GGGCGTGGAGGTACCCACCCTCCTTAGCTGTGTGCTCAGAAGTCCAGAATCCAGACAGGCCAAGGGATAAGCAGCCAGAGAGCTTGTGCATGGAGGTAGGCTACAGGAGAGGGGGTTTCTGTCTGTCTCCAGGAAAGTAAGCAGTAGGGATCTGGATATGCCTACAGTTAACAGTCAGCTCCTCTTTCTCCTCTGTTTCTGGGGATCCTTGTGCTATGCTTTTCAGATGAAGTATGTGGAGGAGGAGTTCTCAGAAATCAAGGAGACCTGGGTGCTCTTGGTGTGTATTGGGGCTACCTCAGGCCTTGGGCGTCTTGTGTCAGGCCACATCAGTGACTCCATCCCTGGACTTAAGAAGATCTACTTGCCAGGTGAGTGTGACCACTTGTCCACTGTGGGGAGAAACAGCCTGCCACAAATGCAAGGTTATCCACAGCCTTTGGGATAGAATGGTAGCTTGTGTGTCGCATGGGGAAAGTCAATCAAAT</p>
5	145	411	<p>CAAGACTTTGAAAGGGCCTAACCATTCAGCCCAACTGCTCTCTCTGTTGACACCTTCCCCCTCCACCACCCCAATTTTATAGATGGTAGAAATGAAGACTTGAGAAAGGAGATGTGATGCTATGTGGTCTTGGCTGCCAGCACAACTGACCTCAGGCCCTGTTTCTCCAGGCCTTTCCCTCCTGCTCCTGGCCCTGATGTCCATGATGATTCCCCTGTGCCGGGACTTCGGGGCCCTATCGTCTGTCTCTTTCCCTGGGCCTTTGCGATGGCTTCTTCATCACCATCATGGCCCCATTGCATTTGAGCTGGTGGGCCCAATGCAGGCCCTCACAGGCCATTGGCTACCTCCTGGGCATGATGGCCCTGCCAATGATTGCTGGGCCCCCAATTGCAGGTGAGGCTGATATCCAGGGAGGGCATGAATCAGGGAGTCCTTTTTTCCCTGGGTACTGGCACTCCTGAGCATCTCTCCTGAGGCCCTTTTCTCTTATCGTCTATTTAAGCAGCTTTGTCA GAGTCCGTGAAAC</p>
6	1.265	395	<p>AAGGCAATACACGCCAAGATTATCTGGATAGGCACTGTGATGGCCCTGAACCGGGCTGAGAGTACCTTTGGACAGTAGGGCAAAGCTGAGCTTGA CTTGTCTCTTTGACTGTTTCAGGCCTACTCCGCAACTGTTTGGGGACTACCATGTGGCCTTCTACTTTGCCGGTGTGCCCCCATCATCGGGGCTGTAATCCTCTTCTCGTCCCTCTGATGCATCAAAGGATGTTCAA GAAAGAGCAGAGAGATTCCAGCAAGGATAAGATGTTGGCCCTGACCCAGACCCCAATGGGGAGCTACTGCCGGGCTCCCCAACCCCTGAGGAACCAATCTAATGCCTTTCTTGCCATTGTGTGCCCTTTCCAGCTCTTCCCCTTCATCCCACCCTGCTCAGCATTACATTTTGCCACCAGCACTTGTTCCCAGACCTGCGCACACAGCATTTCAGCCACCTGACAA TCTCCTGGAGTCAAAGCTCCAGGTGTTCCAAACTCATAACTAAAT TCTCCCAGAATGCTTTTAAATTTTCCAGGGCCTTCTCCTCCAGGATCTGGGAAAGCTTGGGAACCACCCTGGCCTTGGAACTCTCCA TATACTTTCTAAGCTCTGGGGGAGGAGGAGGATGGGACCTCCTGGA CCCAGCTTGTTAGTCACCACTATAATCAACTGCCAAAGGTGCTACTGTGTCCCCAGGAGCCTAATAGGGTAGGCCAAATCTCTGTTTGTG AGGAGGTCATTGCCATCCATATTTGGGAGCCACTGGGTGGAGGGGC AGGGAGGCAAAATGAGACAAGTAGCCTTGGTTAGTCTTAGAGTTGC TGATGACTGTGGCTTCCAAGAACTGGGTACAAGCAGTGCCCTTAT</p>

Exon	Comprimento do Éxon (pb)	Comprimento do amplicon (pb)	Sequência
			<p> TGTATGGTTGGTTAACAGTCTGCTCCCCTCTTCCCCTCCTTCTTTT TTCCCTCTACTGACTTCTCTCCATACTCTTCCCCTCTATTTCTTTGTA TGACTGTCATAGACACATGGGTGCTTGAAGAAAGGAGGGACCCGGA ACTTGGGCCAATCAGCCTCACCTTGTCCCAGTCCACTCCTAACACTA GCATCAGTCCCCTCATCTCAGGCTGAGCCACATCTCACTTTTTTCGC TCAAGCTATATAATCCTAGACTGGAAGAGTAGAATATCATATAGGG AAGAAACCTTAAACACCACAGTGTTCATGTTCCAGTCACTGATTTT TACAAATCTTACAGTCCAAGGCATTAACCTCAAGGCCCTCCCAGCA CCCCATTCTTGTATACACATGGCAAAATGTGAAGAACTCCTTTCAT CTCAGCAGGTAGAGGAGGACTGATGACACGAGCTGCCATGGCGGG AGGAGGGGCAGTAGTTATTGATATGGTGAGCCCATCTCTCAGTTT TCATGACAGGTCTATATTTCTACCTGGGCCAGGCCAGGAAAGAGAC TATTTAAGAAAAAATCAATTCCTAGCCTGGATCCCAAAAAGGT ACAGGCAGCAGTTGCACATAGGGTTGAAAAATTTCTTTTGGGAAGG GGAAGCCATCCCAGCCTTACCACCCAATGTGTCTCCCATGCTGGG CATCCTAGGCCACTTGTCTAGAGGGCATTAAAGGTGCCATGAAAG GTAGACTCTGAACCCTTTGATCCCTCTGAAGTAGGTGACTGATGC CTCCTTATGCCCAGGCTCTGGCAACAGTCTTACTGAAGAACATTCC CAGTGGCCCTGGCTAGGGGCAGAGGGCACTGCCAGGCTGTGTTCA GTTAGCACAGCTCACCTCATTAGGAGCTCAGCCTCTCTCCTCACTCT GCCTCTTTGTGTCTCTTTTTCTCCTCTCTGAGCCTTTGTCTATTGTG TTCCGTGCACCCACCCTTTCATCATCTTTTTGCCAGGCATTCTGGC TGTCACTTGGAGCCAACAGTAACTTGCCACCTTAAGGCAGGGTCAT CCCCGGGCCAGGAGGATGAGGTTGTCCTGAGGGGCTCCAAAGAAG ACAATAGTTCCCCTCATGATTTCCGTTACAAACAGGCAGCTGGG GCATGGTTGGCCTCCAATGATTTCAATCAAGGCCAAAGTCTGAGC CCCCCCGCTGGTCCCAGTCCAGCTCTATCAACTCCCCAAAGGAA AACCCACTGGTCTTAGCTCTGTGGGTAGGAAGGGGCCCTAGAAAG GGCCTAGTACTATCCTGTCTAGTTCTAACAGTAGTGGAACAGGAGA ATCTGGGCCCTAGGAGCCCTGTAACCTCCAGGAGAGACCACTGAAA ATACTGGAGCAACAATGCCCTGCTTCCATTTCTCCCACCTCACTC TCACCAAGTCACCAGAGGGTGGTTCTGTAGGACCTCTTTTGTGGCT TAAGATGCAGATGGCTCTTAAGAATCAGGCAGTCGCCACTTCTCT CCAGATGAAGGGAAGACATTCATAGGTCCCAAATCTGCCCATTCAG ATGTACATAATATGGTGGGATATCAATTTACTTCTTCCACACATGT GGTTGTGCACATGTGAGCTTGTGTGCTTTGGAGAGAATGTTGATT GGCAAAAGCAGCACAGTATTAATATTTAGAGTAGGATGCAGCCTCT TATGCACCACAGTTAAATCTAGAACGAACAAAATTCAGAGCTCAA GACATGGGACATTTAAATCCTCAAGGAGTTTGAACAAAATAAACA GATCT </p>

LEGENDA: AGTATCCT = Região intrônica

GACCCGGA = região UTR

CTGTAATC = região exônica

GTACCTTTG = região dos primers

CACTTGTTCAGACC-região de localização de primers em regiões UTR

Fonte: Ensemble Genome Browse
CHARLES et al., 1995.



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](#)