



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E
BIOLOGIA CELULAR**

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE DO RECEPTOR DE
TIREOTROFINA EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO
CONGÊNITO**

CLEBSON PANTOJA PIMENTEL

BELÉM/PARÁ

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

CLEBSON PANTOJA PIMENTEL

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE DO RECEPTOR DE
TIREOTROFINA EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO
CONGÊNITO**

**Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Neurociências e
Biologia Celular da Universidade Federal
do Pará como requisito para obtenção do
grau de mestre em Biologia Celular.**

**Orientador: Prof. Dr: Luiz Carlos Santana
da Silva**

BELÉM/PARÁ

2010

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE DO RECEPTOR DE
TIREOTROFINA EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO
CONGÊNITO**

**Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Neurociências e
Biologia Celular da Universidade Federal
do Pará como requisito para obtenção do
grau de mestre em Biologia Celular.**

Banca Examinadora

Prof. Dr. Eduardo José Melo dos Santos (ICB/UFPA)

Prof. Dr. Edmar Tavares da Costa (ICB/UFPA)

Prof. Dr^a. Greice de Lemos Cardoso (ICB/UFPA)

BELÉM/PARÁ

2010

AGRADECIMENTOS

A meus pais (Raimundo Valente Pimentel Filho e Alzira de Jesus Barra Pimentel), os quais me proporcionaram educação, além de ensinarem o valor do amor, justiça e solidariedade.

A meus irmãos (Ronaldo, Rosilene, Lucicléia, Márcio, Celeste e Ailton) pela amizade, carinho e apoio.

Ao Professor Luiz Carlos Santana da Silva pela amizade, incentivo e orientação.

Aos meus amigos-irmãos Érik Cortinhas e Cleber Cruz, pela ajuda fundamental no processo de concretização da minha dissertação.

Aos amigos de sempre Camila Pará, Carlos Eduardo, Felipe Tuji, Tássia, Francine, Pedro Freitas, Raíssa Andrade, pelo sentimento de fraternidade que sempre cultivamos.

Aos pais ou responsáveis pelos pacientes.

A Unidade de Referência Especializada Materno-Infantil e do Adolescente (URE-MIA).

Ao Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM), em especial a Biomédica Dayse Alencar.

A agência de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento que possibilitou este estudo.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO 1 | 1 |
| 1.1 GLÂNDULA TIREÓIDE 1 | 1 |
| 1.1.1 Caracterização anatomica e histológica da tireóide | 1 |
| 1.1.2 Aspectos embriológicos da tireóide | 2 |
| 1.1.3 Síntese e secreção dos hormônios da tireóide | 3 |
| 1.1.4 Funções dos hormônios da tireóide | 5 |
| 1.2 HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO (HC) | 6 |
| 1.2.1 Generalidades | 6 |
| 1.2.2 Classificação do Hipotireoidismo | 6 |
| 1.2.3 Epidemiologia do Hipotireoidismo Congênito | 7 |
| 1.2.4 Aspectos Clínicos | 7 |
| 1.2.5 Diagnóstico do Hipotireoidismo Congênito | 8 |
| 1.2.6 Tratamento do hipotireoidismo congênito | 9 |
| 1.3 ASPECTOS GENÉTICOS DO HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO | 10 |
| 1.3.1 Gene TSHR e Disgenesia Tireoidiana TIREOIDIANA | 10 |
| 2. OBJETIVOS | 14 |
| 2.1 Objetivo Geral | 14 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 14 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| 3.1 Caracterização da Amostra | 15 |
| 3.2 Aspectos Éticos | 15 |
| 3.3 Critérios Clínicos e Bioquímicos de Inclusão | 15 |
| 3.4 Coleta e armazenamento das amostras | 16 |
| 3.5 Coleta dos achados clínicos e bioquímicos | 16 |
| 3.6 Extração de DNA | 16 |
| 3.7 Amplificação do gene TSHR | 16 |
| 3.8 Identificação de mutações | 18 |
| 3.9 Análise estatística | 18 |
| 4. RESULTADOS | 19 |
| 4.1 ALTERAÇÕES ENCONTRADAS NO GENE TSHR | 19 |
| 4.1.1 Éxon 1: Polimorfismo c. 154 C>A (P52T) | 19 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 4.1.2 | Éxon 5: Polimorfismo c.561 T>C (N187N) | 20 |
| 4.1.3 | Éxon 10: Polimorfismo C.1377 G>A (A459A) | 21 |
| 4.1.4 | Éxon 10: Polimorfismo c.1935 G>A (L645L) | 22 |
| 4.1.5 | Éxon 10: Polimorfismo c.2181 C>G (D727E) | 23 |
| 4.2 | Descrição dos achados clínicos dos pacientes com HC | 25 |
| 5. | DISCUSSÃO | 26 |
| 5.1 | ANÁLISE MOLECULAR | 26 |
| 5.1.1 | Polimorfismo P52T | 26 |
| 5.1.2 | Polimorfismo N187N | 28 |
| 5.1.3 | Polimorfismo A459A | 29 |
| 5.1.4 | Polimorfismo L645L | 29 |
| 5.1.5 | Polimorfismo D727E | 30 |
| 5.2 | ANÁLISE CLÍNICA E BIOQUÍMICA | 32 |
| 6. | CONCLUSÕES | 33 |
| 7. | REFERÊNCIAS | 34 |

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 01 – Glândula Tireóide | 1 |
| Figura 02 – Folículo Tireoidiano | 2 |
| Figura 03 – Regulação, Síntese e Secreção dos Hormônios | 4 |
| Figura 04 – Polimorfismo c. 154 C>A (P52T) | 19 |
| Figura 05 – Polimorfismo c. 561 T>C (N187N) | 20 |
| Figura 06 – Alteração Nucleotídica C.1377 G>A (A459A) | 21 |
| Figura 07 – Alteração Nucleotídica C.1935 G>A (L645L) | 22 |
| Figura 08 – Alteração Nucleotídica C.2181 C>G (D727E) | 23 |
| Figura 08 – Localização das mutações no TSHR associadas ao HC | 31 |

QUADROS

| | |
|---|-----------|
| Quadro 01 – Participação dos fatores de transcrição no desenvolvimento embrionário da tireóide. | 3 |
| Quadro 02 – Doses recomendadas de levotiroxina em criança de adolescente com hipotireoidismo congênito | 9 |
| Quadro 03 – Deleções causadoras de HC encontradas no gene TSHR | 11 |
| Quadro 04 – Mutações causadoras de HC encontradas no gene TSHR | 12 |
| Quadro 05 – Condições de amplificação do gene TSHR | 16 |
| Quadro 06 – Iniciadores para amplificação do gene TSHR | 17 |

LISTA DE ABREVIATURA

DIT: Diiodotironina

EDTA: Ácido Etileno Diamino Tetra-acético

HC: Hipotireoidismo Congênito

MIT: Monoiodotironina

PAX8: Paired Box Transcription Factor

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PKU: Fenilcetonúria

PNTN: Programa Nacional de Triagem Neonatal

PROTEÍNA NIS: Transportador Simporte Sódio-Iodo

TPO: Tireoperoxidase

TG: Tireoglobulina

TSHR: Receptor do Hormônio Estimulante da Tireóide

TSH: Hormônio Estimulante da Tireóide ou Tireotrofina

TTF1: Fator 1 de transcrição da tireóide

TTF2: Fator 2 de transcrição da tireóide

ThOX1: NADPH Oxidase 1

ThOX2: NADPH Oxidase 2

TRH: Hormônio liberador de Tireotrofina

T3: Triiodotironina

T4: Tetraiodotironina ou Tiroxina

URE-MIA: Unidade de Referência Materno Infantil e Adolescente

Resumo

Introdução: O hipotireoidismo congênito (HC) é a principal causa de deficiência mental passível de prevenção. A maioria dos casos tem origem na mal formação da tireóide, seguido por defeitos na síntese de hormônios tireoidianos e pela transferência de anticorpos de origem materna. Os fatores genéticos envolvidos na etiologia do HC não estão totalmente elucidados, no entanto vários trabalhos demonstraram que alterações no gene do receptor de hormônios da tireóide (TSHR), podem levar ao surgimento HC. **Objetivo:** Este trabalho teve como objetivo geral Investigar alterações no gene TSHR em pacientes com HC primário diagnosticados e tratados na Unidade de Referência Especializada Materno Infantil e Adolescente (URE-MIA/PA); e como objetivos específicos determinar a frequência das mutações encontradas no gene TSHR em pacientes HC primário; determinar o genótipo dos pacientes com HC além de, descrever os achados clínicos e bioquímicos dos pacientes. **Material e métodos:** Para coleta dos dados clínicos e bioquímicos foi consultado os prontuários médicos dos pacientes e para identificação das alterações genéticas foi realizado a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) seguindo do sequenciamento automático direto do gene TSHR. **Resultados:** Neste trabalho foram encontradas as alterações P52T em heterozigose em 4 pacientes, com frequência genotípica (FG) de 4,44% e frequência alélica (FA) 2,22%. O polimorfismo N187N em homozigose em 5 pacientes (FG=5,55%) e em heterozigose em 31 pacientes (FG=34,44%); A FA FOI foi de 22,78%. O polimorfismo A459A em heterozigose em 4 pacientes apresentando frequência genotípica de 4,44% e alélica de 2,22%. E a alteração L645L em heterozigose em apenas um pacientes apresentando uma frequência genotípica de 1,11% e alélica de 0,55%. Os principais achados clínicos foram hérnia umbilical, icterícia precoce, hipotonia, obstrução intestinal, macroglossia e fontanelas amplas. 70% dos pacientes com HC apresentaram pelo menos um tipo de polimorfismo; Foram identificados dois pacientes com o genótipo P52T/N187N e cinco com o genótipo N187N/N187N. Os demais pacientes foram heterozigotos para pelo menos um polimorfismo. Os achados clínicos descritos nesse trabalho corroboram os sinais e sintomas presentes descritos na literatura nos indivíduos com HC.

Palavras chaves: hipotireoidismo, tireotrofina, molecular e receptor.

Abstract

Introduction: Congenital Hypothyroidism (CH) is the main cause of mental deficiency that can be prevented. Most cases are originated on thyroid malformation, followed by defects on thyroid hormones synthesis and by antibodies transference from mother to child. The genetic factors involved on CH etiology are not completely clear, however, several researches showed that alterations on thyroid hormones receptor gene (TSHR) can lead to CH.

Objectives: The main objective was to investigate genetic alterations on TSHR gene in patients with primarily CH diagnosed and treated on Unidade de Referência Especializada Materno Infantil e Adolescente (URE-MIA/PA); and the specific objectives were to determine the mutation frequency on TSHR gene in patients with primarily CH; determine the genotype of these patients, besides describing the clinical and biochemical findings. **Material and methods:**

Medical handbooks were consulted in order to collect clinical and biochemical data and polymerase chain reaction (PCR) technique was realized to identify genetic alterations, followed by direct automatic sequencing of TSHR gene.

Results: The P52T alteration was found in heterozygosis in 4 patients, its genotypic frequency (GF) was 4.44% and the allelic frequency (AF) was 2.22%. The N187N polymorphism was found in homozygosis in 5 patients (GF=5.55%) and in heterozygosis in 31 patients (GF=34.44%); AF was 22,78%. A459A polymorphism was found in heterozygosis in 4 patients, presenting genotypic frequency of 4.44%, and allelic frequency of 2.22%. One patient presented L645L alteration in heterozygosis, with genotypic frequency of 1.11% and allelic frequency of 0.55%. The main clinical findings were umbilical hernia, early jaundice, hypotonia, intestinal obstruction, macroglossy and large fontanel. 70% of CH patients presented at least one kind of polymorphism. Two patients were indentified with P52T/N187N genotype and five with N187N/N187N genotype. Remaining patients were heterozygotes to at least one polymorphism. Clinical findings described in this paper justify signs and symptoms already described on literature in individual with CH.

key words: Hypothyroidism, thyrotropin, Molecular and Receptor

1. INTRODUÇÃO

11.1 GLÂNDULA TIREÓIDE

1.1.1 Caracterização anatomica e histológica da tireóide.

A glândula tireóide normal encontra-se abaixo da laringe, anteriormente à junção das cartilagens tireóide e cricóide (Figura 01). Pesa aproximadamente de 15 a 20g, apresenta um lobo direito e um esquerdo, os quais estão conectados na linha média por um istmo, do qual projeta-se um terceiro lobo chamado piramidal. O lobo piramidal é pequeno e representa um remanescente embrionário da porção inferior do ducto tireoglossos, um canal ligado ao primórdio tireoidiano (Guyton & Hall, 2002).

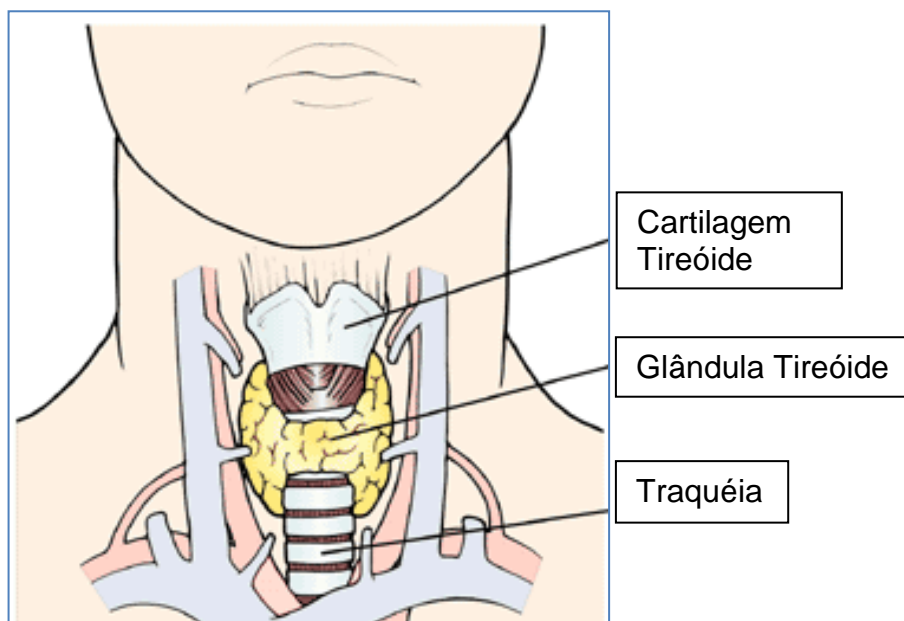


Figura 01. Glândula Tireóide

A unidade funcional da tireóide é o folículo tireoidiano (Figura 02) o qual tem formato de esfera, mede entre 0,2 a 0,9 mm de diâmetro, sendo formado por uma única camada de células epiteliais. O interior de cada folículo é preenchido por um colóide constituído, principalmente, pela glicoproteína iodada denominada tireoglobulina, a qual contém cerca de 115 resíduos de tirosina. Além das células foliculares, é encontrada na tireóide as células C ou parafoliculares cuja função é produzir e secretar o hormônio calcitonina, o qual

está envolvido na regulação do metabolismo do cálcio no organismo (Junqueira & Carneiro, 2004).

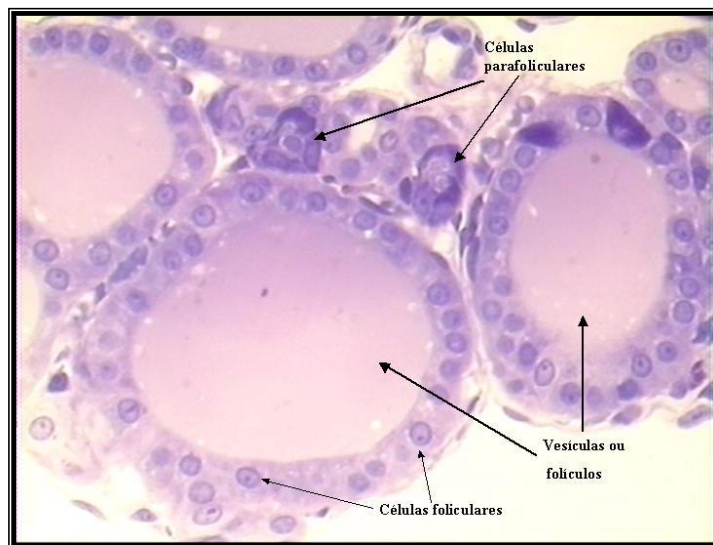


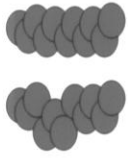

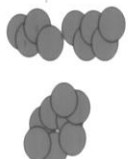
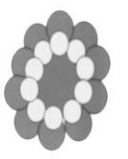

Figura 02. Folículo tireoidiano

1.1.2 Aspectos embriológicos da tireóide

A tireóide é a primeira glândula endócrina a ser formada no embrião humano. Ela inicia seu desenvolvimento entre o 20º a 22º dia após a fecundação. Origina-se a partir de um grupo de células da endoderme localizado no assoalho da faringe primitiva (Kratzch & Pulzer 2008). Esse grupo de células migra na direção caudal e posiciona-se em situação cervical final por volta da sétima semana de gestação (Theiler, 1989 & Perone et al, 2004).

Evidências sugerem que os fatores de transcrição tireoidianos; Fator 1 de transcrição tireoidiano (TTF1), Fator 2 de transcrição tireoidiano (TTF2) e o *paired box transcription factor 8* (PAX8), são fundamentais para a migração e desenvolvimento normal da glândula tireóide. Estes são expressos, preferencialmente, em tireócitos e realizam suas funções ao interagirem com promotores da tireoglobulina (TG), tireoperoxidase (TPO), Hormônio estimulante da tireóide ou tireotrofina (TSH) e seu receptor (TSHR) e/ou outros genes (Park & Chatterjee, 2004).

Quadro 01. Participação dos fatores de transcrição no desenvolvimento embrionário da tireóide.

| | Formação do broto endodérmico | Migração cervical | Sobrevivência de células precursoras | Diferenciação funcional | Expansão das células foliculares |
|-------------|---|---|---|---|---|
| |  |  |  |  |  |
| TTF1 | + | + | + | + | + |
| TTF2 | + | + | + | + | + |
| PAX8 | + | + | + | + | + |

Adaptado de knobel *et al* 2000. TTF1: Fator 1 de transcrição da tireóide; TTF2: Fator 2 de transcrição da tireóide; PAX: *paired box transcription factor* 8; (+) Presença do fator de transcrição.

1.1.3 Síntese e secreção dos hormônios da tireóide

A síntese e secreção dos hormônios tireoidianos dependem de vias metabólicas nas quais está envolvida uma série de proteínas, como hormônio liberador de tireotrofina (TRH), o receptor de TSH (TSHR), Proteína G; Transportador simporte Na^+/I^- (Proteína NIS); TG; TPO; NADPH oxidases (ThOX1 e ThOX2); Pendrina e Desalogenases. No indivíduo saudável, esses processos estão sob o comando de uma regulação fina, a qual atua no eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, realizada por retroalimentação ou feedback (Gillam & Kopp, 2001).

O passo inicial para a síntese dos hormônios da tireóide começa com a secreção pelo hormônio liberador de tireotrofina (figura 03), o qual atua sobre as células basófilas (tireotrofos) da *pars distalis* da adenohipófise estimulando a secreção do TSH. O TSH por sua vez, através da corrente sanguínea, chega à tireóide e se liga ao seu receptor na membrana basal das células foliculares. Esse acoplamento dispara um sinal de segundo mensageiro, via proteína G, o qual estimula a síntese e a ação das proteínas envolvidas no processo (Refetoff *et al.*, 2001).

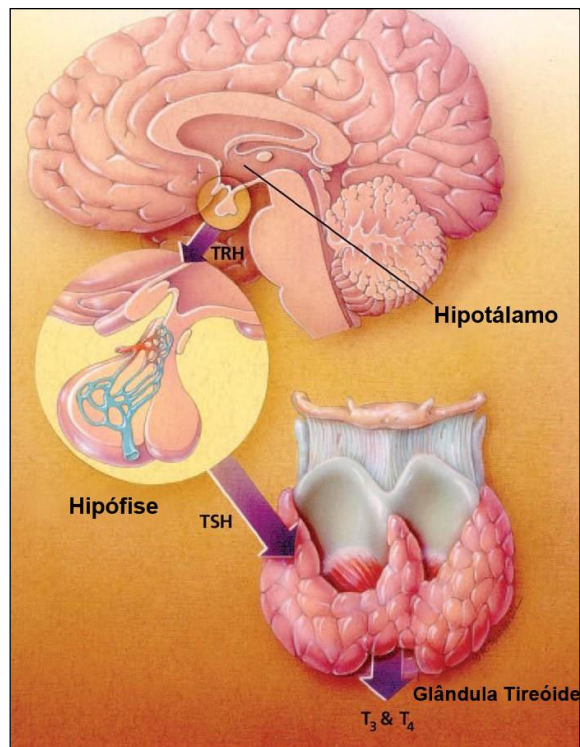


Figura 03. Regulação, Síntese e Secreção dos Hormônios Tireoidianos

No processo de síntese dos hormônios tireoidianos o iodo é um elemento essencial. Ele entra na célula folicular tireoidiana via proteína NIS localizada na membrana basolateral da célula, processo denominado seqüestro de iodo. Após a entrada na célula, o iodo é transportado para o lúmen folicular, através da proteína pendrina. No interior dos folículos o iodo é oxidado e inserido nos resíduos de tirosina da tireoglobulina, por ação da enzima tireoperoxidase. Esse processo é denominado de incorporação do iodo (Royaux *et al.*, 2000).

No final do processo, a tireoglobulina contém moléculas de monoiodotironinas (MIT), diiodotironinas (DIT), triiodotironina (T₃) e tetraiodotironina (T₄) que são armazenados. Diante de estímulo do TSH, formam-se filopódios na superfície apical das células foliculares resultando na endocitose de gotículas de colóide. As vesículas endocitadas contendo colóide se fundem com lisossomos e dentro desta organela os resíduos iodados da tireoglobulina são clivados por proteases e liberados para o citoplasma nas formas de MIT, DIT, T₃ e T₄ livres (Berne & Levy, 2000).

MIT e DIT sofrem ação da enzima iodotirosina-deiodinase também conhecida como desalogenase, disponibilizando iodeto e resíduo de tirosina

para ser reaproveitado pela célula. Enquanto que T_3 e T_4 são secretados pelas células foliculares nos espaços do tecido conjuntivo da tireóide, para ser distribuídos pela corrente sanguínea (Serrano *et al*, 2006).

1.1.4 Funções dos hormônios da tireóide

Após a secreção pelas células foliculares, T_3 e T_4 alcançam a corrente sanguínea e se ligam a proteínas plasmáticas, as quais servem como reservatórios e distribuidores para os tecidos, sendo que apenas cerca de 0,03% a 0,05 de T_4 e T_3 , respectivamente, fica na forma livre. As proteínas plasmáticas distribuidoras são a globina TBG (80% de T_4 e 90% de T_3), a Pré-albumina TBPA (15% a 20% de T_4 e 1% a 5% de T_3), e albumina (5% a 10% T_4 e 5% a 30% de T_3) (De Araújo *et al*, 2003).

À medida que entram nas células-alvo, esses hormônios (especialmente o T_3) interagem com receptores nucleares de hormônios tireoidianos e vão sendo lentamente usados por vários dias ou semanas. Estes hormônios promovem a transcrição de muitos genes, o que culmina com a produção de várias proteínas levando ao aumento generalizado do metabolismo celular (Gartner & Hiatt, 2007).

Os hormônios tireoidianos agem acelerando a taxa do crescimento nos jovens, otimizam os processos mentais, estimulam a atividade das glândulas endócrinas e processos energéticos. Atuam aumentando a síntese de ácidos graxos e a captação de vitaminas. Além de diminuir a síntese de colesterol, triglicerídeos e fosfolípidos (Gartner & Hiatt, 2007).

Segundo De Araújo *et al* (2003), no feto e nos recém-nascidos esses hormônios promovem a diferenciação das células neuronais e glias do sistema nervoso central, desenvolvem dendritos e axônios, estimulam a formação de sinapses, a maturação pulmonar e o desenvolvimento renal.

1.2 HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO (HC)

1.2.1 Generalidades

O HC é a mais comum desordem endócrina neonatal, em regiões iodo suficientes, sendo a principal causa de deficiência mental passível de prevenção. Em aproximadamente 5% dos casos ocorre por transferência de anticorpos de origem materna. Em 10% a 15% o HC tem origem em um dos passos que levam à produção dos hormônios tireoidianos (disormonogênese), enquanto que a grande maioria dos casos, 80% a 85%, surge devido a malformações da glândula tireóide, as quais são denominadas coletivamente de disgenesia tireoidiana (Rúbio *et al*, 2002).

A disgenesia tireoidiana é um grupo heterogêneo de malformações que inclui quatro formas: ectopia, agenesia, hemiagenesia e hipoplasia. A ectopia é a mais freqüente, sendo o tecido tireóide encontrado freqüentemente na base da língua. A agenesia é a segunda mais freqüente e caracteriza-se pela ausência de detecção, pelo isótopo radioativo, de tecido tireóideo em local normal ou em qualquer lugar no trajeto cervical (Ramos *et al*, 2008).

A hipoplasia é caracterizada por uma tireóide com localização normal, hipoplásica, hipofuncional, bilobulada, discretamente detectada por isótopo radioativo. E, finalmente, a hemiagenesia corresponde a uma disgenesia na qual a glândula encontra-se em local anatômico normal, no entanto um lobo da glândula está ausente (Ramos *et al*, 2008).

1.2.2 Classificação do Hipotireoidismo

O HC pode ser classificado em: primário, secundário ou central e periférico. É dito primário se está associado à disgenesia tireoidiana ou à disormonogênese tireoidiana (Gillam & Kopp, 2001). O HC é classificado como central quando há algum defeito no eixo hipotálamo-hipófise, o qual leva ausência ou diminuição da produção de TSH (Vulsma & de Vijlder, 2002). O HC é denominado periférico quando há resistência dos tecidos-alvo ao hormônio tireoidiano (Refetoff *et al.*, 1993).

1.2.3 Epidemiologia do Hipotireoidismo Congênito.

A incidência global do HC é a 1: 4.000 nascidos vivos (Serrano *et al*, 2006). Nos Estados Unidos e Canadá a incidência é de 1: 4.000, no Brasil a estimativa é de 1 afetado para cada 3.500 nascidos vivos. No Japão a taxa é mais elevada, 1: 3.000. No entanto, segundo Kratzch & Pulzer (2008), é na Holanda onde se verifica a maior incidência, 1: 1.800 nascidos vivos.

Em relação ao gênero, o HC acomete duas vezes mais mulheres quando comparado aos homens. Essa maior frequência no gênero feminino é um achado particularmente interessante, porém não se sabe se as mulheres são mais susceptíveis ou se o feto feminino tem maior taxa de sobrevivência com a doença quando comparada ao masculino (Amieva *et al*, 2004).

1.2.4 Aspectos Clínicos

O HC é uma doença progressiva sendo somente 1% a 5% dos casos diagnosticados clinicamente (Carranza *et al*, 2006), uma vez que a maioria dos afetados, até o terceiro mês de vida, apresentam uma aparência normal, provavelmente devido a passagem de hormônios tireoidianos da mãe para o feto através da placenta (Dantas *et al*, 2007).

Mesmo quando apresentam alterações, as manifestações clínicas são inespecíficas, a exemplo de mialgia, artralgia, câimbras, pele seca. Unhas quebradiças, cabelos finos e palidez também são achados inespecíficos presente nesta patologia.

As evidências clínicas, em 95% dos casos, surgem entre o terceiro e o sexto mês de vida. Os sinais mais frequentes são icterícia fisiológica prolongada, hipotermia, hipoatividade cerebral, macroglossia, fontanela grande, ronco, dificuldades para alimentação, assim como hérnia umbilical, sonolência, anemia refratária e bradicardia (Borges *et al*, 2006).

1.2.5 Diagnóstico do Hipotireoidismo Congênito

O diagnóstico do HC é feito através do teste de triagem neonatal (TN), conhecido como teste do pezinho. A TN é realizada desde a década de 70, no entanto somente em 1992 tornou-se obrigatória. Em 2001, foi instituído o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), o qual passou a contemplar além do HC e fenilcetonúria, a fibrose cística e as hemoglobinopatias (Borges *et al*, 2006).

No Pará, o programa têm uma cobertura de 77,33%, com um total de 430 postos de coleta de sangue. O Laboratório de Apoio à Pesquisa e ao Diagnóstico da Universidade do Estado do Pará (UEPA) é o responsável por realiza a triagem neonatal. Os pacientes diagnosticados com Fenilcetonúria e HC são atendidos na Unidade de Referência Especializada Materno Infantil e Adolescente (URE-MIA); os pacientes com diagnóstico de Fibrose Cística são atendidos no Hospital Universitário João de Barros Barreto; enquanto que os pacientes com Hemoglobinopatias e Anemia Falciforme são atendidos na Fundação Hemocentro do Pará (HEMOPA) (DATASUS, 2007).

Dentre as doenças diagnosticadas pela TN, o HC é a patologia de maior freqüência. O diagnóstico é realizado através da dosagem de TSH no sangue colhido em papel filtro. O teste deve ser realizado entre terceiro e o sétimo dia após o nascimento. Quando o valor da mensuração do TSH fica entre 10 e 20 mUI/L, é solicitada uma segunda amostra de sangue, para para confirmação ou exclusão diagnóstica (Portaria Nº 848, de 31 de outubro de 2002).

A maioria dos pacientes com valores de TSH >20 mUI/L apresenta HC, no entanto é importante descartar uso de drogas antitireoidianas pela mãe ou de soluções iodadas em berçário, ou ainda o hipotireodismo materno que poderá levar à passagem placentária de auto-anticorpos bloqueadores da tireóide fetal, como causas de hipotireoidismo transitório (Zakarija *et al*, 1990).

Para o diagnóstico etiológico do HC, é indicada a realização de outros exames tais como: dosagem de T₄ livre e TSH, ultra-sonografia da tireóide, cintilografia com captação tireóidea de iodo radioativo (valor de referência 14% à 40%), dosagem de tireoglobulina, anticorpo anti-tireoidianos (anti-TG e anti-TPO) e anticorpos anti-receptor de TSH (Franco *et al*, 2002).

1.2.6 Tratamento do hipotireoidismo congênito.

O tratamento farmacológico do HC é baseado na administração de levotiroxina, a qual deve ser tomada em jejum e pelo menos 4 horas de diferença entre a administração de outras medicações, uma vez que, a absorção deste fármaco pode ser afetada por drogas como colestiraminas, sulfato ferroso, cálcio e alguns antiácidos que contém hidróxido de alumínio. A vida média da levotiroxina é de sete dias, e a resposta máxima é atingida na segunda semana de tratamento. É administrada uma vez ao dia, pela manhã. O quadro 02 mostra as doses recomendadas para crianças e adolescentes (Setian, 2007).

Quadro 02: Doses recomendadas de levotiroxina para crianças e adolescentes com hipotireoidismo congênito

| Idades | Dose ($\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$) |
|--------------|---|
| 0 a 3 meses | 10 a 15 |
| 3 a 12 meses | 6 a 10 |
| 1 a 3 anos | 4 a 6 |
| 3 a 10 anos | 3 a 5 |
| 10 a 16 anos | 2 a 4 |

Adaptado de Setian, 2007

Essas doses devem ser reajustadas conforme as variações laboratoriais e sinais de superdosagens como irritabilidade, perda de sono, rubor, diarreia, taquicardia e sudorese (Setian, 2007). O tratamento precoce é fundamental para o desenvolvimento normal das crianças afetadas com HC, evitando o dano neurológico e a deficiência mental que é uma característica frequente e irreversível, em crianças não tratadas (Silva *et al*, 2005).

1.3 ASPECTOS GENÉTICOS DO HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO

Os fatores genéticos envolvidos na etiologia do HC não estão totalmente elucidados, no entanto vários trabalhos, nos últimos anos, demonstraram que deleções, inserções e mutações de ponto em diferentes genes podem levar ao surgimento HC.

1.3.1. Gene TSHR e Disgenesia Tireoidiana

O TSHR pertence à superfamília de receptores associados à proteína G, que exibem estrutura comum consistindo de sete segmentos transmembrana, três alças extracelulares, três alças intracelulares, extremidade extracelular aminoterminal e intracelular carboxiterminal. O TSHR está envolvido nos estágios finais da organogênese da tireóide; além de ser o principal intermediador das ações do TSH no crescimento, diferenciação e função das células da glândula tireóide (Knobel *et al*, 2001; Zheng Liu *et al*, 2008).

O gene que codifica o receptor de TSH, em humanos, está no locus 14q31, sendo constituído por 10 éxons distribuído em 191,1 Kb (Kopp, 2001). O éxon 10 é o maior e tem como função codificar os domínios transmembrana e intracelular do receptor. Os éxons 1 a 9 e parte do éxon 10 são responsáveis pela codificação dos domínios extracelulares (Agretti *et al*, 2001).

Nagayama *et al* (1989) relataram que o gene TSHR é responsável pela produção de uma proteína composta de 764 resíduos de aminoácidos. Em 1990, Misrahi *et al* revelaram que a proteína TSHR madura contém 743 aminoácidos, sendo 394 resíduos no domínio extracelular, 266 resíduos no domínio transmembrana e 83 resíduos no domínio intracelular.

Em 1994, Stein *et al*, utilizando camundongo da linhagem *Hyt* como modelo experimental, foram os primeiros a sugerir a participação do receptor de TSH na diferenciação, crescimento e função da tireóide. Os autores demonstraram que os camundongos que exibiam mutações no quarto segmento transmembrana do receptor não apresentavam resposta via AMPc quando estimulado pelo TSH.

Em 1995, Sunthornthepvarakul *et al* estudaram uma família composta por mãe, pai e três filhas. As filhas apresentavam níveis de hormônios tireoidianos normais, no entanto a concentração de TSH sérico era elevada o que caracterizava uma condição denominada de hipotireoidismo compensado. Os autores utilizando técnicas de biologia molecular e celular identificaram alterações no TSHR e comprovaram que estava relacionado à mutação no gene do receptor de TSH.

As mutações que afetam o TSHR podem ocasionar ganho ou perda de função (HC). Os pacientes com mutações no gene TSHR, que causam perda

de função, apresentam total ou parcial resistência ao TSH, hipoplasia tireoideana, defeitos na síntese e secreção de T₃ e T₄. Essas condições são conhecidas como hipertireotropinemia e caracterizam-se por apresentar um quadro bioquímico alterado (concentrações sanguíneas elevadas de TSH e níveis normais ou baixos de hormônios tireoidianos) (Koop, 2001).

Os quadros 03 e 04 a seguir resumem as deleções e mutações descritas na literatura, que causam perda de função no TSHR.

Quadro 03 – Deleções causadoras de HC encontradas no gene TSHR

| Deleção | Éxon | Referências |
|---|------|--|
| Deleção do éxon devido a transversão de G para C na posição +3 do doador splicing | 6 | Gagné <i>et al.</i> , 1998. |
| AG -> splicing variante (íntron5/éxon6) | 6 | Bretones <i>et al.</i> , 2001. |
| Deleção de 18pb / Inserção de 4pb | 10 | Biebermann <i>et al.</i> , 1997. |
| Deleção de AC no códon 655 (ACT) | 10 | Gagné <i>et al.</i> , 1998. Alberti <i>et al.</i> , 2002. |

Adptado de <http://www.uni-leipzig.de/innere/tshr/> 2004

Quadro 04 – Mutações causadoras de HC encontradas no gene TSHR

| TSHR (resíduo) | Aminoácido Normal | Aminoácido Mutante | Seqüência Normal | Seqüência Mutante | Éxon | Referência |
|----------------|-------------------|--------------------|------------------|-------------------|------|---|
| 41 | Cisteína | Serina | TGC | TCC | 1 | De Roux <i>et al.</i> , 1996. Alberti <i>et al.</i> , 2002. |
| 109 | Arginina | Glutamina | CGG | CAG | 4 | Clifton-Bligh <i>et al.</i> , 1997. |
| 162 | Prolina | Alanina | CCT | GCT | 6 | Sunthornthepvarakul <i>et al.</i> , 1995. De Roux <i>et al.</i> , 1996. Tonacchera <i>et al.</i> , 2001. Costagliola <i>et al.</i> , 1999. |
| 167 | Isoleucina | Ácido Aspártico | ACC | CCC | 6 | Sunthornthepvarakul <i>et al.</i> , 1995. Costagliola <i>et al.</i> , 1999. |
| 310 | Arginina | Cisteína | CGC | TGC | 10 | Russo <i>et al.</i> , 2000. |
| 324 | Glutamina | Códon de término | CAG | TAG | 10 | De Roux <i>et al.</i> , 1996. |
| 390 | Cisteína | Triptofano | TGT | TGG | 10 | De Roux <i>et al.</i> , 1996. Bierbmann <i>et al.</i> , 1997. |
| 410 | Ácido Aspártico | Asparagina | GAC | AAC | 10 | De Roux <i>et al.</i> , 1996. |
| 450 | Arginina | Histidina | CGC | CAC | 10 | Nagashima <i>et al.</i> , 2001. |
| 467 | Leucina | Prolina | CTG | CCG | 10 | Alberti <i>et al.</i> , 2002. |
| 477 | Treonina | Isoleucina | ACT | ATT | 10 | Tonacchera <i>et al.</i> , 2000. |
| 498 | Glicina | Serina | GGT | AGT | 10 | Nagashima <i>et al.</i> , 2001 |
| 525 | Fenilalanina | Leucina | TTC | TAG | 10 | De Roux <i>et al.</i> , 1996. |
| 546 | Triptofano | Códon de término | TGG | TAG | 10 | De Roux <i>et al.</i> , 1996. Clifton-Bligh <i>et al.</i> , 1997. |
| 553 | Alanina | Treonina | GCC | ACC | 10 | Abramowicz <i>et al.</i> , 1997 |
| 600 | Cisteína | Arginina | TGT | CGT | 10 | Alberti <i>et al.</i> , 2002 |
| 609 | Arginina | Códon de término | CGA | TGA | 10 | Tiosano <i>et al.</i> , 1999. |

Adptado de <http://www.uni-leipzig.de/innere/tshr/>

O estudos de base celular e molecular sobre o TSHR, estão cada vez mais sendo intensificados. Isso se justifica pelo fato dessa proteína ser essencial tanto para o desenvolvimento embriológico como para a fisiologia da tireóide. A maioria das mutações descritas na seqüência codificante deste receptor encontra-se no éxon 10, podendo ser mutações de ponto ou deleções de alguns pares de base.

O padrão de herança do HC primário é na maioria dos casos autossômico recessivo (Koop, 2001). No entanto Sunthorntheprarakul *et al.* (1995) descreveram um modelo de herança autossômica dominante para resistência parcial ao TSH, sugerindo mutações em apenas um dos alelos do gene TSHR. Esses pacientes apresentam os mesmos sinais clínicos de pacientes com mutações nos dois alelos do TSHR, porém de intensidade menor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Investigar alterações no gene TSHR em pacientes com HC primário diagnosticados e tratados na Unidade de Referência Especializada Materno Infantil e Adolescente (URE-MIA/PA).

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a frequência das mutações encontradas no gene TSHR em pacientes com HC primário;
- Determinar o genótipo dos pacientes com HC.
- Descrever os achados clínicos e bioquímicos dos pacientes com HC.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização da Amostra

A amostra estudada neste trabalho foi composta por 90 pacientes com diagnóstico de HC (66 do sexo masculino e 24 do sexo feminino), na faixa etária entre 3 a 15 anos de idade, tratados na Unidade de Referência Especializada Materno-Infantil e do Adolescente (URE-MIA).

3.2 Aspectos Éticos

Este estudo está de acordo com os princípios éticos básicos das diretrizes e normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará (Anexo I).

As famílias dos pacientes foram convidadas a participar deste estudo e receberam um folheto com informações (Anexo II). Aos pais ou responsáveis, que autorizaram a participação das crianças no estudo, foi fornecido o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo III). Após esse procedimento, foi realizada a coleta de uma amostra de sangue do paciente.

3.3 Critérios Clínicos e Bioquímicos de Inclusão

O critério fundamental para a inclusão dos pacientes foi o diagnóstico confirmado de HC, realizada através da avaliação clínica e bioquímica dos pacientes, considerando a dosagem do hormônio TSH em sangue impregnado em papel filtro.

3.4 Coleta e armazenamento das amostras

Uma amostra de sangue total (5 a 10mL) foi obtida por punção venosa e colhida em frascos de vidro de 10mL, contendo 54 μ L de Ácido Etileno Diamino Tetra-acético (EDTA). A amostra foi identificada (nome do paciente, data e hora da colheita) e armazenada a -20°C até o momento da extração de DNA.

3.5 Coleta dos achados clínicos e bioquímicos

Os achados clínicos e bioquímicos disponíveis dos pacientes com HC foram obtidos de seus prontuários médicos encontrados na Unidade de Referência Especializada Materno-Infantil e do Adolescente (URE-MIA).

3.6 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada segundo o método descrito por Sambrook *et al.*, 1989.

3.7 Amplificação do gene TSHR

O gene TSHR foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) de acordo com as condições descritas no quadro 05. Logo após a amplificação os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1%.

Quadro 05– Condições de ampliações gene TSHR

| | Estágios | Número de Ciclos | Temperatura | Tempo (minuto) |
|----|----------------------|-------------------------|--------------------|-----------------------|
| 1º | Desnaturação inicial | 1 | 94 °C | 5 |
| 2º | Desnaturação | 30 | 94°C | 1 |
| | Anelamento | | 53 à 61 °C | 1 |
| | Extensão | | 72 °C | 1 |
| 3º | Extensão final | 1 | 72 °C | 5 |

Adaptado de Asubel *et al.*, 1996.

Os iniciadores (*primers*) que foram usados para amplificar o gene e regiões intrônicas adjacentes do gene estão descritos no quadro 06 abaixo.

Quadro 06 – Iniciadores para amplificação do gene TSHR

| | Iniciadores | Temperatura de anelamento |
|----|-------------------------------|---------------------------|
| 1 | 1F: CTCCCGGGTCTCCTTTGG | 58 °C |
| | 1R: CCTGATCTCTCCCGGGTACT | |
| 2 | 2F: CAGCCAACATATTGTGAAAAGT | 53 °C |
| | 2R: CTGCCATTGATTTATGCAAGT | |
| 3 | 3F: GGGAAGCGCATAACAAAAAG | 57 °C |
| | 3R: TGGAGCCCCAAGATTATCAG | |
| 4 | 4F: GGTACCCTGTGGCGTAAATG | 57 °C |
| | 4R: CCCCCAGAAAAGTAGGATGG | |
| 5 | 5F: GGAAGGTGTTGGGAGTTTGA | 56 °C |
| | 5R: CAAACAAAATATTGTCAAACATGG | |
| 6 | 6F: TAAGTGCATATGCGCAGCAA | 57 °C |
| | 6R: ATGGCTCTTGGATGGTCTGT | |
| 7 | 7F: TGTGGGACCTGAAAAACCTT | 61 °C |
| | 7R: CCCTTGACTTACACAGCATCC | |
| 8 | 8F: TGGTCACATTTTATTCTGATATTTG | 57 °C |
| | 8R: CCTTAATGTCTCCATTTATTCCAA | |
| 9 | 9F: CCATCCCTCCTTAGACCAGA | 57 °C |
| | 9R: TCCACCAAGGTCTTTTGTCA | |
| 10 | 10AF: CCAGCCAATGTTTGCATTTT | 56 °C |
| | 10AR: CTGGCCAAAACCAATGATCT | |
| | 10BF: TGGGTACAAGGAAAAGTCCAA | 57 °C |
| | 10BR: AGGTACATCCCCATGCAGAA | |
| | 10CF: TCTCCTCACCAGCCACTACA | 61 °C |
| | 10CR: AGACGATGACGAAGGCAACT | |
| | 10DF: TGCTTCCTTTGGTGGGAATA | 56 °C |
| | 10DR: TGCTGTTCTTTGGAGGAACC | |
| | 10EF: ACTCCTGTGCCAATCCATTC | 61 °C |
| | 10ER: AGCTATGTGTTGGGGGTGTC | |

Adaptado de Alves et al., 2008.

3.8 Identificação de mutações

Este trabalho utilizou a técnica de seqüenciamento automático (kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1) para a investigação de possíveis mutações e/ou polimorfismos no gene TSHR. Os iniciadores utilizados para o seqüenciamento foram os mesmos utilizados na PCR.

3.9 Análise estatística

As freqüências das mutações encontradas foram calculadas pela divisão do número de alelos portadores das mesmas pelo número total de alelos pesquisados. Para a determinação dos valores percentuais este coeficiente foi multiplicado por 100. O programa *Bioestat* (versão 5.0) foi usado para a análise estatística dos resultados apresentados neste estudo.

4. RESULTADOS

4.1. ALTERAÇÕES ENCONTRADAS NO GENE TSHR:

4.1.1 Éxon 1: Polimorfismo c. 154 C>A (P52T)

O polimorfismo P52T foi encontrado em heterozigose em 4 pacientes (figura 04), apresentando freqüência genotípica de 4,44%. A freqüência alélica do polimorfismo foi de 2,22%. Dois dos pacientes para o polimorfismo P52T também apresentaram o polimorfismo N187N, no éxon 7, considerados, portanto, heterozigotos compostos (vide figura 5).

Os dados clínicos dos pacientes com o polimorfismo P52T revelaram hérnia umbilical (67%), obstrução intestinal (33%), icterícia prolongada (33%), hipoatividade (33%), pele seca (33%), bócio (33%). Dois destes pacientes realizaram o exame de cintilografia com captação de iodo radioativo. Um deles foi classificado com ectopia tireoidiana e outro com disormonogênese. A média de TSH dos pacientes foi de 67,15 mUL/mL \pm 77,01mUL/mL.

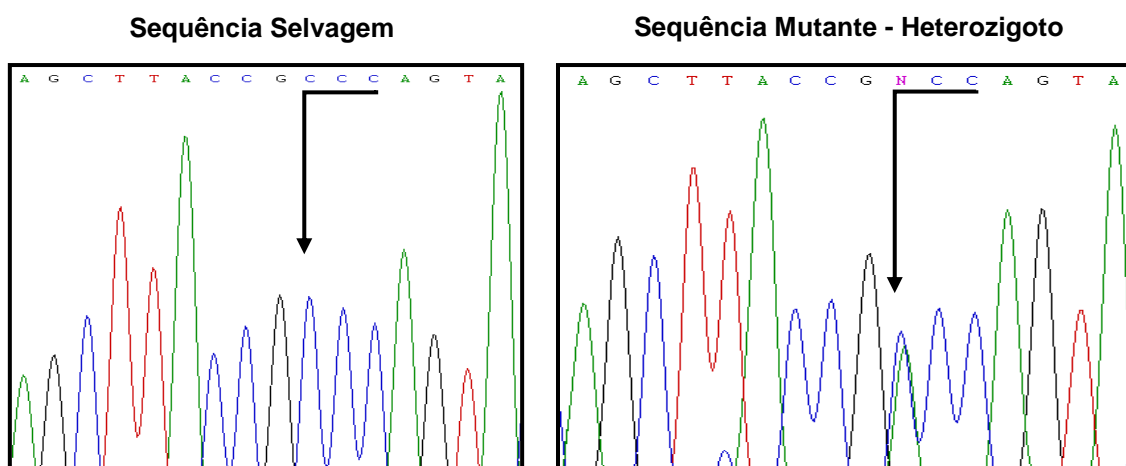


Figura 04: Polimorfismo c. 154 C>A (P52T)

4.1.2 Éxon 5: Polimorfismo c.561 T>C (N187N)

O polimorfismo N187N foi encontrado em homozigose em 5 pacientes (frequência genotípica de 5,55%) e em heterozigose em 31 pacientes (frequência genotípica de 34,44%). A frequência alélica do polimorfismo foi de 22,78%. A figura 05 mostra estes achados.

Os principais achados clínicos contidos nas fichas dos pacientes foram: obstrução intestinal (68,8%), hérnia umbilical (62,5%), icterícia prolongada (43,8%), fontanelas amplas (31,3%), hipoatividade (18,8%), choro rouco (18,8%), macroglossia (18,8%), alargamento da base do nariz (18,8%), pele seca (18,8%), hipotonia (12,5%), língua protusa (6,3%), bócio (6,3%).

Dez dos trinta e seis pacientes realizaram o exame de cintilografia; dos quais 5 pacientes apresentaram ectopia tireoidiana, 4 apresentaram disormonogênese e 1 apresentou hipoplasia tireóidea. O valor médio do TSH foi de 85,15 mUL/mL \pm 72,90 mUL/mL.

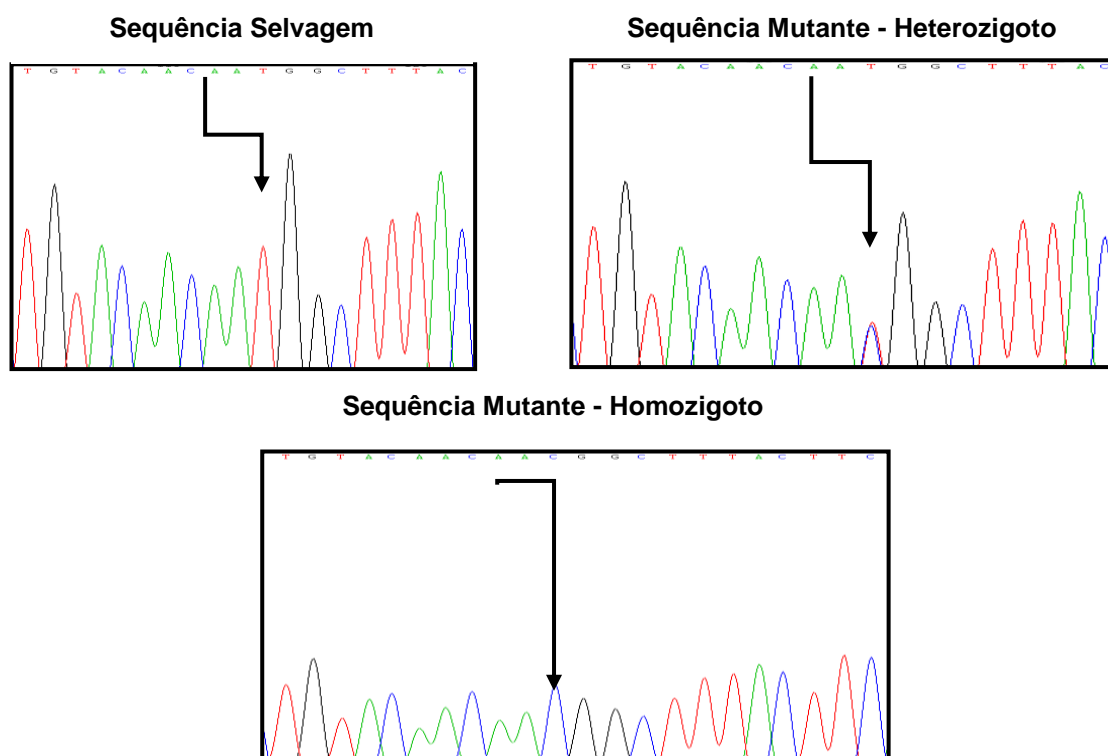


Figura 05: Polimorfismo c. 561 T>C (N187N)

4.1.3 Éxon 10: Polimorfismo C.1377 G>A (A459A)

A alteração nucleotídica causada pela transição de uma guanina por uma adenina na posição 1377 (figura 06) do gene do TSHR, não altera o resíduo de alanina (códon 459) do TSHR. Essa alteração foi encontrada em heterozigose em 04 pacientes (frequência genotípica de 4,44% e alélica de 2,22%).

Os pacientes com o polimorfismo A459A apresentavam hérnia umbilical, obstrução intestinal e hipotonia. Em um destes pacientes a cintilografia não revelou captação de iodo ^{131}I por parte da tireóide. Os outros três pacientes não realizaram o teste de cintilografia. O valor médio da dosagem de TSH destes pacientes no momento do diagnóstico foi elevado ($94,27 \text{ mUL/mL} \pm 12,66 \text{ mUL/mL}$).

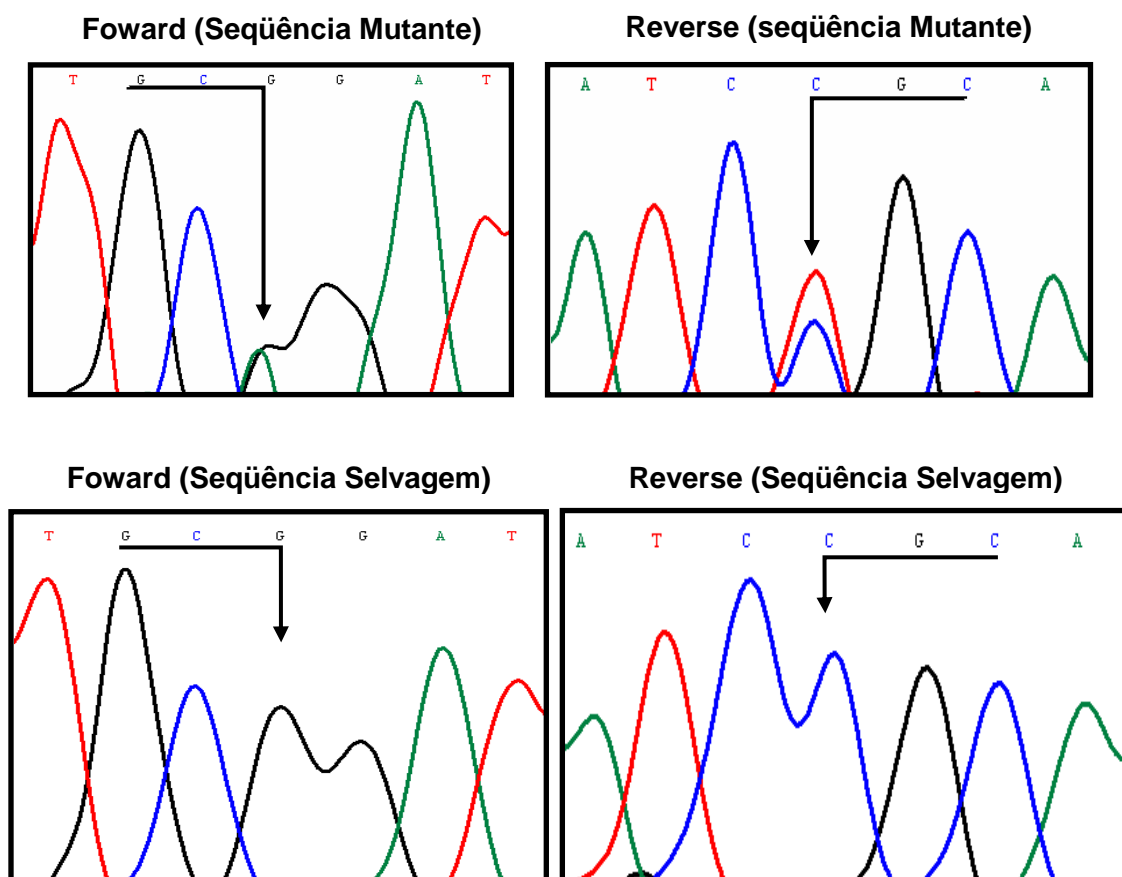


Figura 06 – Alteração Nucleotídica C.1377 G>A (A459A)

4.1.4 Éxon 10: Polimorfismo c.1935 G>A (L645L)

A alteração nucleotídica causada pela transição de uma guanina por uma adenina na posição 1935 (figura 07) do gene do TSHR, não altera o resíduo de leucina (códon 645) do TSHR. Essa alteração foi encontrada em heterozigose em apenas um pacientes com HC (frequência genotípica de 1,11% e alélica de 0,55%).

Foi observado que o paciente portador da alteração L645L apresentava obstrução intestinal e icterícia precoce. O teste do pezinho revelou valor de TSH 22,48 mUL/mL (triagem neonatal) e a dosagem do TSH e do T₄ livre no soro foi de 172 mUL/mL e 0,26 ng/dL, respectivamente. A cintilografia revelou captação de 13,21% de I¹³¹ por parte da tireóide.

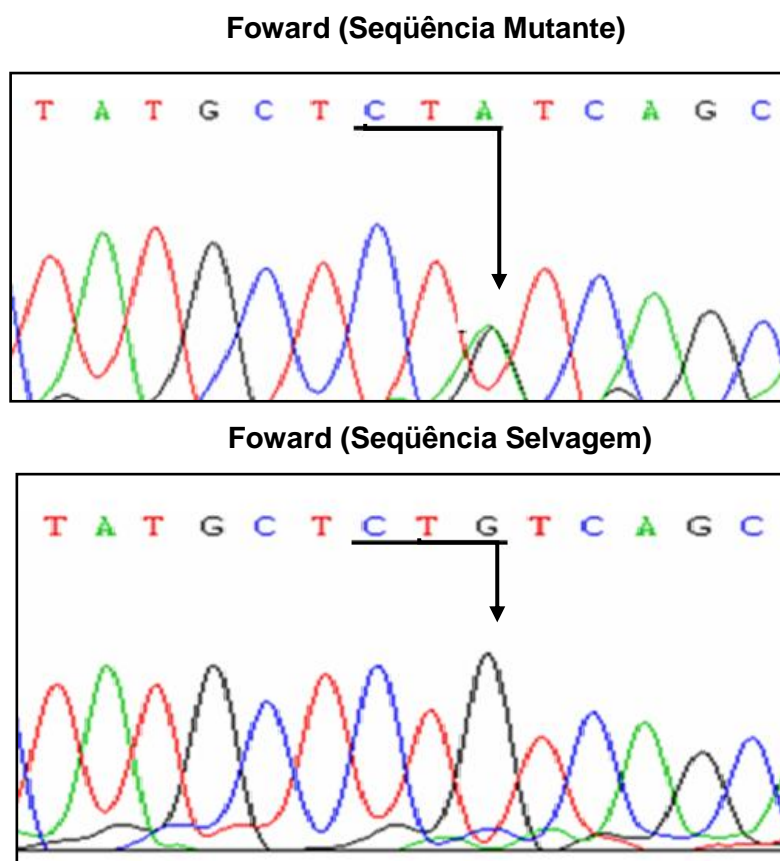


Figura 7 – Alteração Nucleotídica C.1935 G>A (L645L)

4.1.5 Éxon 10: Polimorfismo c.2181 C>G (D727E)

A alteração nucleotídica causada pela transversão de uma citosina por uma guanina na posição 2181 (figura 08) do gene do TSHR altera o resíduo de ácido aspártico para ácido glutâmico (códon 727) do TSHR. Essa alteração foi encontrada em heterozigose em 18 pacientes representado uma frequência genotípica de 20% e alélica de 10%.

A análise clínica dos pacientes portadores da alteração D727E revelou que 39% apresentavam hérnia umbilical, 39% obstrução intestinal, 33,33% icterícia precoce, 27,77% choro fraco e rouco, 27,77% pele seca e áspera, 22,22% macroglossia, 22,22% hipotonia e 22,22% fontanelas amplas.

O valor médio de TSH apresentado pelos pacientes com a alteração D727E foi elevado ($82,22\text{mUL/mL} \pm 43,46\text{mUL/mL}$) e a dosagem T_4 livre no soro foi de $0,55\text{ng/dL} \pm 0,39\text{ng/dL}$. O teste de cintilografia foi realizado por 8 pacientes e os resultados foram: 5 pacientes com hipoplasia, 2 pacientes com agenesia e 1 paciente com bócio hipercaptante.

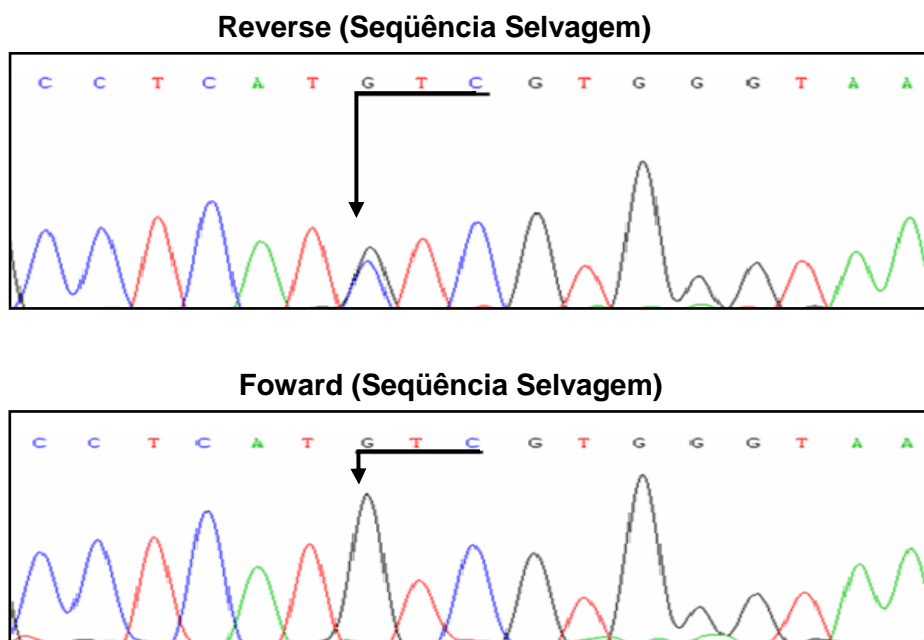


Figura 08: Alteração Nucleotídica C.2181 C>G (D727E)

A tabela abaixo descreve as alterações nucleotídicas encontradas nos pacientes, as frequências genotípicas e alélicas, os achados clínicos, além dos valores médios do hormônio estimulante da tireóide (TSH) encontrados na primeira dosagem, realizada na triagem neonatal.

Tabela 01: Polimorfismos e principais achados clínicos e bioquímicos em pacientes com HC

| Polimorfismos | Frequência Genotípica | Frequência Alélica | Achados clínicos | TSH no teste do pezinho |
|---------------|-----------------------|--------------------|---|------------------------------------|
| P52T | 4/90 (4,44%) | 2,22% | Hérnia umbilical (66,7%), obstrução intestinal (33,3%), icterícia prolongada (33,3%), hipoatividade (33,3%), pele seca (33,3%). | 67,15 mUL/mL ± 77,01 mUL/mL |
| N187N | 36/90 (40%) | 22,78% | Obstrução intestinal (68,8%), Hérnia umbilical (62,5%), icterícia prolongada (43,8%), fontanelas amplas (31,3%), hipoatividade (18,8%), choro rouco (18,8%), macroglossia (18,8%), alargamento da base do nariz (18,8%), pele seca (18,8%), hipotonia (12,5%), língua protusa (6,3%), bócio (6,3%). | 85,15 mUL/mL ± 72,90 mUL/mL |
| A459A | 4/90 (4,44%) | 2,22% | Hérnia Umbilical, obstrução intestinal e Hipotonia | 94,27 mUL/mL* ± 12,66 mUL/mL |
| L645L | 1/90 (1,11%) | 0,55% | Icterícia precoce e obstrução intestinal | 22,48 mUL/mL* 172 mUL/mL** |
| D727E | 18/90 (20%) | 10% | 39% hérnia umbilical e obstrução intestinal; 33% icterícia precoce; 27,77% choro fraco e rouco e pele áspera; 22,22% macroglossia e hipotonia. | 82,22mUL/mL* ± 43,46mUL/mL |

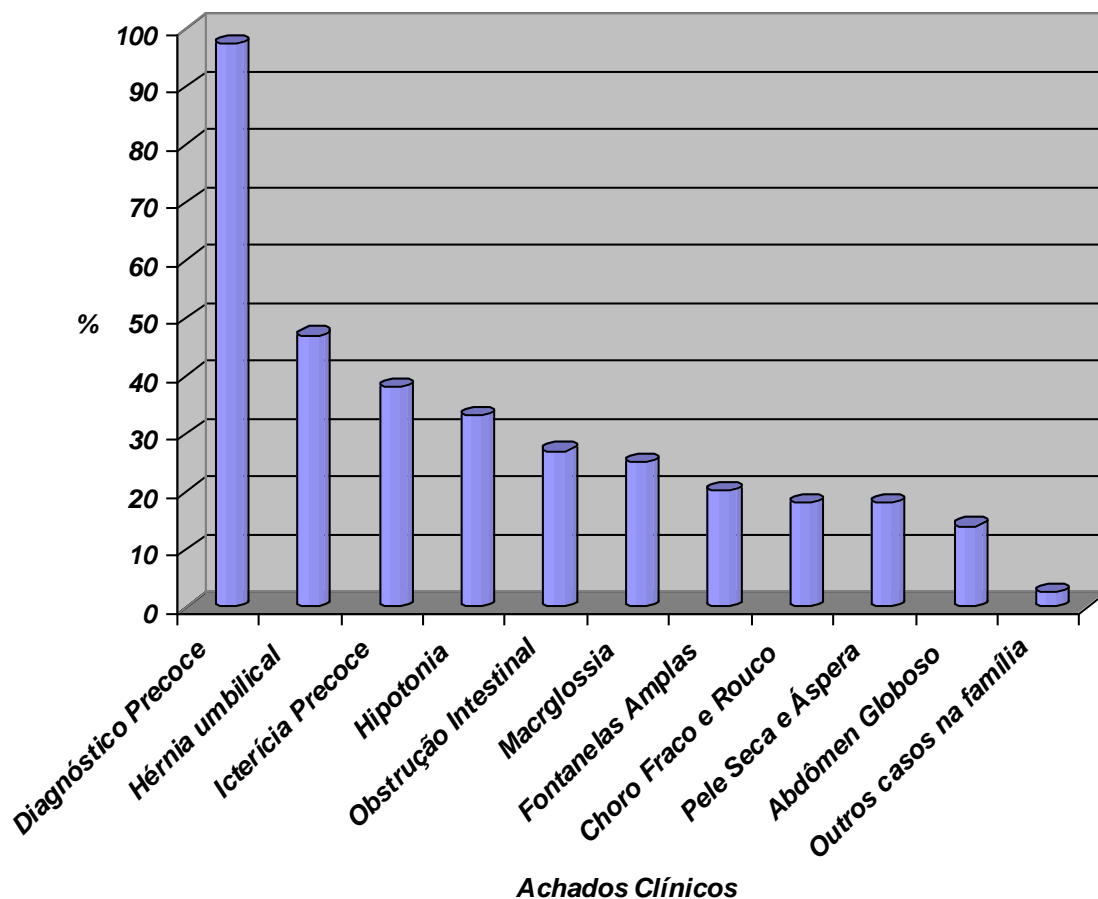
Valores de referência. TSH < 15,00 mUL/mL; T₄ Livre: 0,89 – 1,76 ng/dL.

Média ± Desvio padrão; * valor da dosagem realizada pela triagem neonatal; ** valor da dosagem realizada no soro; ***Pvalor=0,725

4.2. Descrição dos achados clínicos dos pacientes com HC

Os achados clínicos dos pacientes (gráfico 01) revelaram que 47% dos pacientes estudados apresentaram hérnia umbilical, 38% icterícia precoce, 33% hipotonia, 27% obstrução intestinal, 25% macroglossia, 20% fontanelas amplas, 18% choro fraco e rouco, 18% pele seca e áspera e 14% abdômen globoso. Em 97,5% dos casos o diagnóstico foi precoce e em 2,2% da amostra havia outro caso de HC na família.

Gráfico 01 – Achados clínicos dos Pacientes com HC



5. DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE MOLECULAR

Diversas alterações no gene TSHR foram relatadas como sendo responsáveis por disfunções tireoidianas, sejam elas adquiridas ou hereditárias. Essas alterações podem atuar tanto no ganho de função do receptor quanto na perda, diminuindo a resposta ao hormônio TSH (Park & Chatterjee, 2004).

Em ambos os casos, o TSHR mutante causa alteração dos níveis plasmáticos de hormônios tireoidianos, o que o torna um importante alvo de estudos na análise do funcionamento da tireóide.

5.1.1 Polimorfismo P52T

No presente estudo, o polimorfismo P52T apresentou frequência alélica de 2,22%. Os quatro pacientes foram heterozigotos para o alelo variante. O polimorfismo P52T é uma alteração que resulta na substituição de um resíduo de prolina por um resíduo de treonina. Alguns autores sugerem que este polimorfismo poderia causar uma alteração na conformação da porção extracelular do TSHR, podendo tornar o receptor alvo de anticorpos ou levar à expressão e regulação anormais do TSHR (Bohr *et al.*, 1993).

Loos *et al.* (1995) mostraram que o polimorfismo P52T, quando expresso em células ovarianas de hamsters chineses, foi capaz de elevar a produção de AMPc. Dessa forma, especula-se a possibilidade do polimorfismo intensificar o hipertireoidismo em pacientes com Doença de Graves.

Alguns autores apóiam essa hipótese. Cuddihy *et al.* (1995b) encontraram uma frequência elevada do P52T em mulheres com Doença de Graves e de Hashimoto, em comparação ao grupo de mulheres saudáveis. Esta mesma relação não foi encontrada em homens. Um estudo feito na Espanha mostrou frequência de 7,5% para o polimorfismo P52T em um grupo de 62 pacientes com hipertireoidismo (Palos *et al.*, 2006).

Ho *et al.*, 2003 realizaram um estudo em um grupo de 164 pacientes com Doença de Graves e mostraram uma frequência de 11,4% para o

polimorfismo P52T, sendo mais prevalente em Indianos (frequência alélica: 16,5%), e raro em Chineses (frequência alélica: 0,5%). Neste mesmo estudo, os pacientes com o alelo P52T apresentaram níveis significativamente menores de anticorpos anti-Tireoglobulina e anti-TPO, quando comparados àqueles que não apresentaram polimorfismo.

Entretanto, a maior parte dos estudos subseqüentes não confirmou esses achados. O polimorfismo foi encontrado com igual frequência tanto em pacientes com Doença de Graves quanto em indivíduos saudáveis (Kotsa *et al.*, 1997; Allahabadia, *et al.*, 1998; Sunthornthepvarakul *et al.*, 1999; Simanainen *et al.*, 1999; Kaczur *et al.*, 2000; Chou *et al.*, 2002). Outros estudos também mostraram indivíduos homozigotos para o alelo variante que não apresentavam quaisquer sintomas na tireóide (Cuddihy *et al.*, 1995a; Tonacchera *et al.*, 1996).

Estudo realizado na Inglaterra em 307 indivíduos saudáveis, revelou que 29 apresentaram o polimorfismo em heterozigose e 3 em homozigose. Os dados bioquímicos disponíveis de 2 dos 3 indivíduos homozigotos para o alelo, indicaram níveis plasmáticos normais de TSH e T4 livre (Cuddihy *et al.*, 1995a). Tonacchera *et al.* (1996) expressaram tanto o receptor mutante quanto o selvagem em células COS-7, e a análise por radioimunoensaio mostrou níveis equivalentes de atividade do AMPc em ambos os tipos de receptores.

Sunthornthepvarakul *et al.* (1994), em um estudo realizado nos EUA, relataram frequência de 12% para o receptor variante em um grupo de 60 indivíduos saudáveis. Os autores não encontraram relação entre a presença do polimorfismo e os níveis séricos de T4 livre e TSH.

O polimorfismo P52T foi encontrado em 1 paciente com tireóide hipoplásica, em um grupo de 35 pacientes com HC estudados no estado do Paraná (Ramos *et al.*, 2009).

5.1.2 Polimorfismo N187N

O polimorfismo N187N apresentou expressiva frequência alélica na população estudada (22,78%). A troca de bases T>C na posição 561 do gene não altera o aminoácido asparagina na posição 187 do receptor de TSH, possivelmente não tendo relação com as disfunções tireoidianas. Um estudo realizado com 60 indivíduos caucasianos não relacionados, na Argentina, revelou a presença do polimorfismo N187N em 15 indivíduos, dos quais 2 eram homozigotos para este polimorfismo. A frequência do alelo variante foi de 14,0%. Este mesmo estudo mostrou que todos os indivíduos portadores do N187N também apresentavam os polimorfismos intrônicos g.IVS5 - 69C > T e g.IVS6 + 13A > G (Esperante *et. al.*, 2008).

Yaun e colaboradores (2008) analisaram 79 pacientes com HC e 100 indivíduos saudáveis e não encontraram diferença significativa em relação à presença do polimorfismo N187N.

Entretanto, outros achados servem de base para que os estudos acerca dessa variante sejam aprofundados. Olsmail *et al.* (2009) analisaram duas gerações (n=13) de uma família com 5 casos de hipertireoidismo não auto-imune (4 irmãos e uma tia paterna). O seqüenciamento dos 10 éxons do gene TSHR mostrou a combinação de duas variantes genômicas em todos os indivíduos afetados, no pai (não afetado) e em mais dois irmãos com hipertireoidismo subclínico. As duas variantes encontradas foram o polimorfismo N187N e a variante intrônica IVS7+68T>G. Ambas foram encontradas apenas em heterozigose. Essas alterações não se apresentaram nos demais membros não afetados da família (mãe e outros 4 irmãos) (Ismail *et. al.*, 2009).

Lonn *et al.* (2007) observaram uma diminuição sugestiva do risco de desenvolvimento de carcinoma papilar da tireóide em indivíduos que apresentavam o polimorfismo N187N. Foram analisados 167 pacientes e 491 indivíduos saudáveis. O *odds ratio* encontrado foi de 1.0, nos homozigotos para o alelo selvagem; 0.7, nos indivíduos heterozigotos para o polimorfismo e 0.6 para os homozigotos para o N187N ($p=0.11$).

Em relação a esses dois polimorfismos encontrados (P52T e N187N), não existem trabalhos suficientes que comprovem associação ou ausência de

associação dessas alterações com disfunções tireoidianas, sejam elas relacionadas ao hiper ou hipotireoidismo.

Dessa forma, é necessário que demais estudos sejam realizados para que se conheça melhor a atuação desses polimorfismos. Faz-se importante a comparação dos dados encontrados neste trabalho com uma análise realizada em um grupo controle, para que se conheça a frequência dessas alterações em populações saudáveis do nosso meio.

Além das alterações nos éxons 1 e 7, foram encontradas três alterações nucleotídicas no éxon 10; sendo duas transições de uma guanina para uma adenina nas posições 1377 (GCG→GCA) e 1935 (CTG→CTA); e uma transversão de citosina para guanina na posição 2181 (GAC→GAG). As duas primeiras transições não alteram o resíduo de aminoácido na estrutura final do TSHR.

5.1.3 Polimorfismo A459A

A transição GCG→GCA (A459A) na posição 1377 foi identificada em quatro pacientes (4,4%), todos em heterozigose. Gabriel *et al* (1999), descreveram esse polimorfismo (A459A) na seqüência de nucleotídeos do TSHR em sete pacientes que apresentavam câncer de tireóide, porém não há nenhum relato na literatura deste polimorfismo em pacientes com HC.

5.1.4 Polimorfismo L645L

A transição em heterozigose CTG→CTA na posição 1935 foi identificada em apenas um paciente (1,11%). Esta alteração nunca foi descrita na literatura e por não influenciar na constituição do TSHR (L645L), ela pode se configurar como um novo polimorfismo na seqüência de nucleotídeos deste receptor. No entanto, é fundamental um estudo desta alteração em um grupo controle a fim de definir sua frequência alélica na população.

5.1.5 Polimorfismo D727E

A transversoão GAC→GAG na posição 2181 já havia sido descrita na literatura como um dos polimorfismos na seqüência gênica do TSHR (Gabriel *et al.*, 1999; Sykiotis *et al.*, 2003; Guoa *et al.*, 2005). O presente estudo mostrou que 72 pacientes com HC (80%) foram homozigotos GAC/GAC e 18 (20%) foram heterozigotos GAC/GAG. A freqüência alélica nessa amostra foi de 90,0% para GAC e 10,0% para GAG. Estas freqüências não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao grupo controle (freqüência genotípica 17,6% e freqüência alélica 8,8%).

Gabriel *et al.* (1999) sugeriram que a presença do polimorfismo D727E é importante na patogênese do bócio tóxico multinodular. Essa alteração foi encontrada em oito (33,33%) dos vinte e quatro pacientes. No mesmo trabalho, realizaram estudos em um grupo controle (N=52) e em pacientes com doença de Graves (N=49) e obtiveram os seguintes resultados: cinco indivíduos controle (9,62%) apresentaram a mutação D727E em heterozigose e 8 indivíduos com doença de Graves (16,32%) foram heterozigotos.

Com o objetivo de elucidar qual a atuação deste polimorfismo no bócio tóxico multinodular e na doença de Graves, os pesquisadores caracterizaram (*in vitro*) a expressão do TSHR selvagem e do TSHR D727E na superfície de células COS-7 transfectadas com DNA complementar destes dois tipos de receptores. Os resultados deste experimento não apontaram diferença significativa na expressão do TSHR normal e TSHR D727E, ou seja, a presença do polimorfismo não interfere na expressão do TSHR (Gabriel *et al.*, 1999).

Gabriel *et al.* (1999) realizaram um estudo para testar a capacidade do TSHR D727E em estimular a produção de AMPc. Este experimento mostrou uma diferença significativa, indicando que a produção de AMPc foi maior na presença do TSHR D727E. No entanto, Skylotis *et al.* (2003) revelaram que não houve diferença significativa na produção de AMPc entre os dois tipos de receptores: TSHR selvagem e TSHR D727E.

A figura 09 mostra a localização dos polimorfismos encontrados nos pacientes com HC.

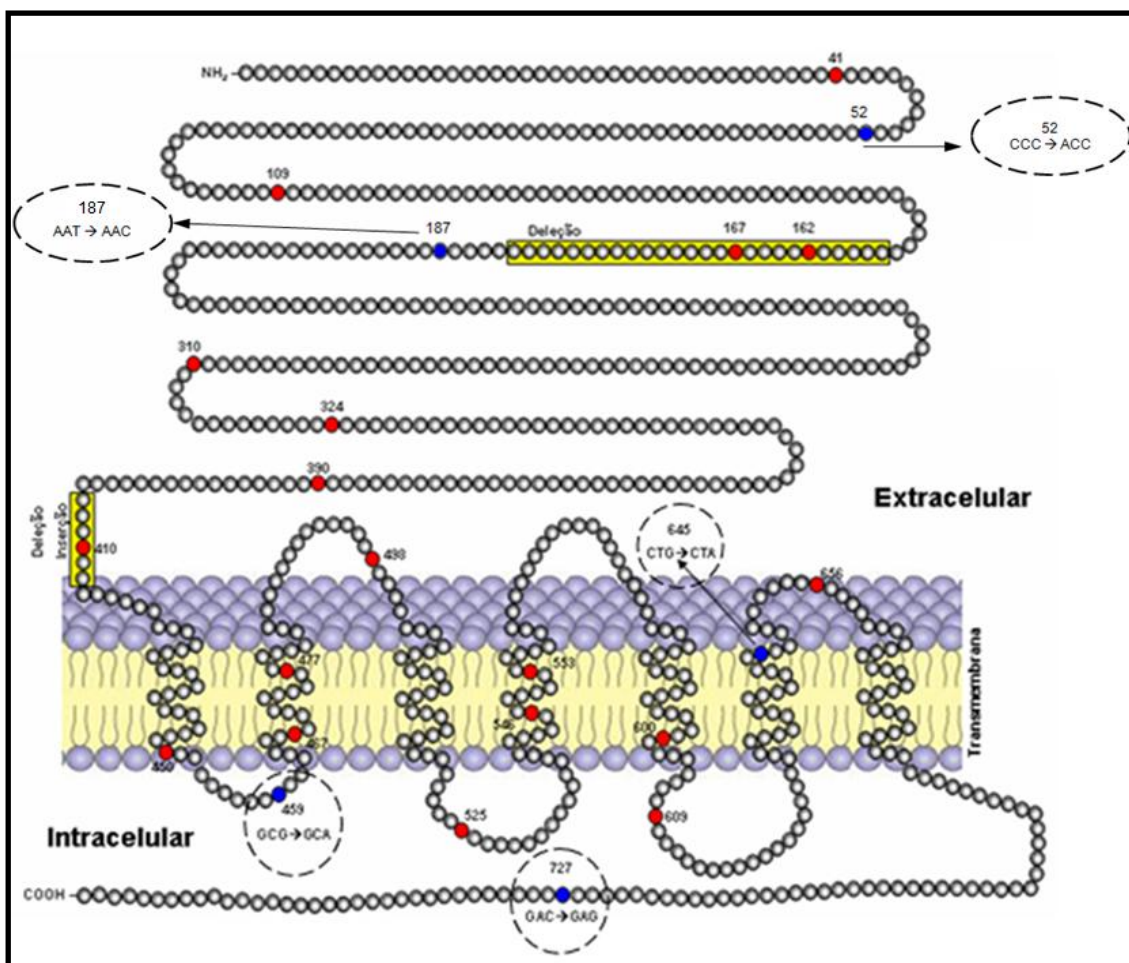


Figura 09 – Localização das alterações encontradas no TSHR

Não foram encontradas alterações nos exons 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 9 do gene TSHR nos pacientes com HC. 70% (63/90) dos pacientes com HC apresentaram pelo menos um dos polimorfismos encontrados neste estudo.

Uma vez que a o desenvolvimento da glândula tireóide é controlado por vários genes, seria de fundamental importância a investigação molecular de outros genes a exemplo do PAX8, TTF1 e TTF2, no intuito de determinar a participação destes genes na etiologia do HC. Outra abordagem interessante seria a expressão *in vitro* da alteração D727E para investigar a real influência deste polimorfismo na função do TSHR. Além do estudo *in vitro*, poderia ser relevante conhecer a distribuição deste polimorfismo em pacientes com câncer de tireóide.

5.2 ANÁLISE CLÍNICA E BIOQUÍMICA

Com a implantação do programa de triagem neonatal para HC, foi possível acumular dados a respeito dos sintomas clínicos desta doença (Kempers *et al.*, 2006).

Os fenótipos clínicos e bioquímicos dos pacientes que apresentaram alterações nos éxons 1, 7 e 10 do gene TSHR estão de acordo com os achados e sintomas clássicos de pacientes com HC (Law *et al.*, 1998; Tahirovic & Toromanovic, 2005; SBEM - Projeto diretrizes, 2005).

É importante ressaltar que o diagnóstico de HC não é feito por análise clínica, visto que os sintomas levam tempo para aparecer, sendo fundamental a realização da triagem neonatal, para evitar o aparecimento dos sintomas irreversíveis, como por exemplo, a deficiência mental.

O tratamento do HC baseia-se na reposição via oral do hormônio sintético Levotiroxina. Essa terapêutica é instituída após a dosagem plasmática dos hormônios TSH e T₄. Nos casos de HC os valores encontrados para o TSH são elevados e os valores de T₄ podem ou não estar abaixo do valor de normalidade (Kempers *et al.*, 2006).

Os fenótipos clínicos e bioquímicos dos pacientes com HC que apresentaram mutações não foram exclusivos deste grupo, uma vez que os mesmos achados foram encontrados em pacientes com HC sem mutação.

A maioria dos pacientes com HC não apresentou outro caso na família (97,8% dos casos) e apenas 2,2% dos pacientes fazia referência a outro caso de HC na família. Estes achados estão de acordo com outros estudos (Vulsma & Vijlder, 2002; Castanet *et al.*, 2001).

6. CONCLUSÕES

- As frequências alélicas para os polimorfismos P52T, N187N, A459A, L645L e D727E em pacientes com HC foram 2,22%, 22,78%, 2,22%, 0,55% e 10,0%, respectivamente.
- 70% (63/90) dos pacientes com HC apresentaram pelo menos um tipo de polimorfismo: P52T (4,44%), N187N (40,0%), A459A (4,44%), L645L (1,11%) e D727E (20,0%).
- Foram identificados dois pacientes com o genótipo P52T/N187N (2,22%) e cinco com o genótipo N187N/N187N (5,55%). Os demais pacientes foram heterozigotos para pelo menos um polimorfismo (62,23%).
- Não foram encontradas alterações nos exons 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 9 do gene TSHR nos pacientes com HC analisados.
- Os polimorfismos encontrados nos éxons 1, 7 e 10 do gene TSHR não explicam a etiologia do HC nos pacientes analisados.
- Os achados clínicos e bioquímicos encontrados nos pacientes com HC e que apresentaram pelo menos um polimorfismo são os mesmos achados clássicos de pacientes com HC.

7. REFERÊNCIAS

- AGRETTI, P.; CHIOVATO, L.; DE MARCO, G.; MARCOCCI, C.; MAZZI, B.; SELLARI FRANCESCHINI, S.; VITTI, P.; PINCHERA, A.; TONACCHERA, M. Real-time PCR provides evidence for thyrotropin receptor mRNA expression in orbital as well as in extraorbital tissues, *Eur. J. Endocrinol.* 147 733–739. 2002.
- ALBERTI, L.; PROVERBIO, M.C.; COSTAGLIOLA, S.; ROMOLI, R.; BOLDRIGHINI, B.; VIGONE, M.C.; WEBER, G.; CHIUMELLO, G.; BECK-PECCOZ, P.; PERSANI, L. Germline mutations of TSH receptor gene as cause of nonautoimmune subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(6):2549-55. 2002.
- AMIEVA, M.V.; CARDIEL, ANDRADE, M.P.; CORTÉS, J.; CONTRERAS, C.R.G.; VELAZQUEZ, V.O. Epidemiología del hipotiroidismo congénito en México. *salud pública de méxico / vol.46, no.2, marzo-abril de 2004.*
- ALLAHABADIA A, HEWARD JM, MIJOVIC C, CARR-SMITH J, DAYKIN J, COCKRAM C, BARNETT AH, SHEPPARD MC, FRANKLYN JA, GOUGH SC. Lack of association between polymorphism of the thyrotropin receptor gene and Graves' disease in United Kingdom and Hong Kong Chinese patients: case control and family-based studies. *Thyroid* 8: 777–780. 1998.
- ASUBEL, F.; BRENT, R.; KIRGSTON, R.; MOORE, D.; SLIDMAN, J.; SMITH, S. *Current Protocols in Molecular Biology.* New York: John Wiley Sons; 1989.
- BEARTDSALL, K. & OGILVY-STUART, A. Congenital Hypothyroidism. *Current Peadiatrics.* 14: 422-429. 2004.
- BERNE, R.M. & LEVY, M.N. *Fisiologia* Editora: Guanabara Koogan. 4º edição. 2000.
- BIEBERMANN, H.; SCHONEBERG, T.; KRUDE, H.; SCHULTZ, G.; GUDERMANN, T.; GRUTERS, A. Mutations of the human thyrotropin receptor gene causing thyroid hypoplasia and persistent congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 82(10):3471-80. 1997.

- BORGES, A.B.; OLIVEIRA, L.Q.; COLARES, P.D.T. A importância da triagem neonatal no diagnóstico precoce do hipotireoidismo congênito. *Estudos Goiânia*, v 33, n. 11/12, p925-935, nov/dez, 2006.
- BOHR UR, BEHR M, LOOS U. A heritable point mutation in an extracellular domain of the TSH receptor involved in the interaction with Graves' immunoglobulins. *BiochimBiophys Acta* 1216: 504–508. 1993.
- DATASUS; Brasil; Ministério da saúde, 2007.
- BRETONES, P.; DUPREZ, L.; PARMA, J.; DAVID, M.; VASSART, G.; RODIEN, P. A familial case of congenital hypothyroidism caused by a homozygous mutation of the thyrotropin receptor gene. *Thyroid*. (10):977-80. 2001.
- CASTANET, M.; POLAK, M.; BONAIITI-PELLIE, C.; LYONNET, S.; CZERNICHOW, P.; LEGER, J. Nineteen Years of National Screening for Congenital Hypothyroidism: Familial Cases with Thyroid Dysgenesis Suggest the Involvement of Genetic Factors. *Vol 86, No. 5. 2009-14. 2001.*
- CARRANZA, D.; VIELT, G.V.; POLAK, M. Hypothyroidie congenital. *Ann. Endocrinol.* 67, 4: 295-302, 2006.
- CHOU, HSIANG-TAI; YI-RU SHI, CHWEN-TZUEI CHANG AND FUU-JEN TSAI. The Polymorphisms of Codon 727 and 52 of Thyroid-Stimulating Hormone Receptor Gene are not Associated with Mitral Valve Prolapse Syndrome in Taiwan Chinese. *Japanese Heart Journal*. Vol. 43 No. 6 pp.655-666. 2002.
- CLIFTON-BLIGH, R.J.; WERTWORTH, J.M.; HEINZ, P.; CRISP, M.S; JOHN, R.; LAZARUS, J.H.; LUDGAT, M.; & CHATTERJEE, N.K. Mutation of the encoding human TTF2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nature genetics* volume 19. 1998.
- COSTAGLIOLA, S.; SUNTHORNTEPVARAKUL, T.; MIGEOTTE, I.; VAN SANDE, J.; KAJAVA, A.M.; REFETOFF, S.; VASSART, G. Structure-function relationships

of two loss-of-function mutations of the thyrotropin receptor gene. *Thyroid*. 9(10):995-1000. 1999.

CUDDIHY RM, BRYANT WP, BAHAN R. Normal function in vivo of a homozygotic polymorphism in the human thyrotropin receptor. *Thyroid*. Aug;5(4): 255–257. 1995 (a).

CUDDIHY RM, DUTTON CM, BAHN RS. A polymorphism in the extracellular domain of the thyrotropin receptor is highly associated with autoimmune thyroid disease in females. *Thyroid* Apr;5(2): 89–95. 1995 (b).

DAMANTE, G. & DILAURO, R. Thyroid-specific gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1218: 255-266. 1994.

DANTAS, M.; PEREIRA, M.; TORALLES, M.B.; ALVES, C. A importancia da riagem neonatal no hipotireoidismo congênito: análise secundária de dados. *Gazeta médica da Bahia* julho 2007.

DATHAN, N.; PARLATO, R.; ROSICA, A.; DE FELICE, M.; DI LAURO, R. Distribution of the *tif2/foxe1* gene product is consistent with an important role in the development of foregut endoderm, palate and hair. *Dev. Dyn.* 224, 450–456. 2002.

DE ARAÚJO, M.C.K.; DA SILVA, M.H.B.N.; DINIZ, E.M.A.; VAZ, F.A.C. A tireóide no feto e no recém-nascido: Peculiaridades funcionais e principais doenças tireoidianas. *Pediatria São Paulo*, 25 (1/2):51-60. 2003.

DE ROUX, N.; MISRAHI, R.; BRAUNER, R.; HOUANG, M.; CAREL, J.; GRANIER, M. Four families with loss of function mutations of the thyrotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4229-35. 1996.

DEVRIENDT, K.; VANHOLE, C.; MATTHIJS, G; DE ZEGHR, F. Deletion of thyroid transcription factor-1 gene in an infant with neonatal thyroid dysfunction and respiratory failure. *The New England journal of medicine* 338(18):1317-8; 1998.

ESPERANTE, SEBASTIÁN A., CARINA M. RIVOLTA, MARIELA CAPUTO, ROGELIO GONZÁLEZ-SARMIENTO AND HÉCTOR M. TARGOVNIK. Identification and characterization of new variants of three associated SNPs and a microsatellite in the TSH receptor gene which are useful for genetic studies. *Molecular and Cellular Probes* Volume 22, Issues 5-6, October-December 2008, Pages 281-286. 2008.

FRANCO, D.B.; MARGOTTO, P.R.; & ALMEIDA, R. Hipotireoidismo Congênito. *Assistência ao Recém-Nascido de Risco*, 2ª Edição, 2002.

GABRIEL, E.M.; BERGERT, E.R.; GRANT, C.S.; VAN HEERDEN, J.A.; THOMPSON, G.B.; MORRIS, J.C. Germline polymorphism of codon 727 of human thyroid-stimulating hormone receptor is associated with toxic multinodular goiter. *J Clin Endocrinol Metab.* 84(9):3328-35. 1999.

GAGNÉ, N.; PARMA, J.; DEAL, C.; VASSART, G.; VAN VLIET, G. Apparent congenital athyreosis contrasting with normal plasma thyroglobulin levels and associated with inactivating mutations in the thyrotropin receptor gene: are athyreosis and ectopic thyroid distinct entities? *J Clin Endocrinol Metab* 83:1771-5. 1998.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. *Tratado de histologia em cores*. Terceira edição. Pg 317 a 321. 2007.

GILLAM, M.P. & KOPP, P. Genetic defects in thyroid hormone synthesis. *Current Opinion in Pediatrics* 13:364-372. 2001.

GUYTON, A.C.; HALL, J.L. *Tratado de fisiologia médica* 10 ed. Ed. Guanabara Koogan, S.A. Rio de Janeiro, 2002.

HO SC, GOH SS, KHOO DH. HO SC, GOH SS, KHOO DH. Association of Graves' disease with intragenic polymorphism of the thyrotropin receptor gene in a cohort of Singapore patients of multi-ethnic origins. *Thyroid.* Jun;13(6):523-8. 2003.

- ISMAIL SI, MAHMOUD IS, AL-ARDAH M, ABDELNOUR A, YOUNES NA. Detection of combined genomic variants in a Jordanian family with familial non-autoimmune hyperthyroidism. *J Genet.* Aug;88(2):233-8. 2009.
- IWATANI, N.; MABE, H.; DEVRIENDT, K.; KODAMA, M.; MIIKE, T. Deletion of NKX2.1 gene encoding thyroid transcription factor-1 in two siblings with hypothyroidism and respiratory failure. *J Pediatr.* Aug;137(2):272-6; 2000.
- JUNQUEIRA & CARNEIRO. *Histologia Básica*. 10^o edição. Ed. Guanabara. 2004.
- KACZUR V, TAKACS M, SZALAI C, FALUS A, NAGY Z, BERENCSI G, BALAZS C. Analysis of the genetic variability of the 1st (CCC/ACC, P52T) and the 10th exons (bp 1012–1704) of the TSH receptor gene in Graves disease. *Eur J Immunogenet* 27:17–23. 2000.
- KEMPERS, M. J. E.; LANTING, C. I.; VAN HEIJST, A. F. J.; VAN TROTSBURG, A. S. P.; WIEDIJK, B. M.; DE VIJLDER, J.J.M.; VULSMA, T. Neonatal Screening for Congenital Hypothyroidism based on Thyroxine, Thyrotropin, and Thyroxine-Binding Globulin Measurement: Potentials and Pitfalls. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(9):3370-3376. 2006.
- KNOBEL, M.; NOGUEIRA, C.R. & MEDEIROS-NETO, G. *Genética Molecular do Hipotireoidismo Congênito*. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol 45 nº 1 Fevereiro 2001.
- KOPP, P. The TSH receptor and its role in thyroid disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1301–1322. 2001.
- KOTSA KD, WATSON PF, WEETMAN AP. No association between a thyrotropin receptor gene polymorphism and Graves' disease in the female population. *Thyroid* Feb;7:31–33. 1997.
- KRATZCH, J.; PULZER, F. Thyroid gland development and defects. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* Vol. 22, No. 1, pp. 57–75, 2008.

- LÖNN S, BHATTI P, ALEXANDER BH, PINEDA MA, DOODY MM, STRUEWING JP, SIGURDSON AJ. Papillary Thyroid Cancer and Polymorphic Variants in *TSHR*- and *RET*-Related Genes: a Nested Case-Control Study within a Cohort of U.S. Radiologic Technologists. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* Jan;16(1):174-7. 2007.
- LOOS U, HAGNER S, BOHR UR, BOGATKEWITSCH GS, JAKOBS KH, VAN KOPPEN CJ. Enhanced cAMP accumulation by the human thyrotropin receptor variant with the Pro52Thr substitution in the extracellular domain. *Eur J Biochem.* 232:62– 65. 1995.
- MANSOURI, A; CHOWDHURY, K.; GRUSS, P. Follicular cells of the thyroid gland require Pax-8 gene function. *Nat Genet.* 19:87-90. 1998.
- MACCHIA, PE., LAPI, P., KRUDE, H., PIRRO MT., MISSERO C.; CHIOVATO, L., SOUABNE, A., BASERGA, M., TASSI, V., PINCHARA, A., FENZI, G. GRUTERS A., BUSSLINGER, M. DILAURO, R. PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nat Genet.*19:83-6;1998.
- MISRAHI, M.; LOOSFELT, H.; ATGER, M.; SAR, S.; GUIOCHON-MANTEL, A.; MILGROM, E. Cloning, sequencing and expression of human TSH receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 15;166 (1):394-403. 1990.
- MORENO, J.C.; DE VIJLDER, J.J.M.; VULSMA, T.; RIS-STALPERS, C. Genetic basis of hypothyroidism: recent advances, gaps and strategies for future research. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* Vol.14 No.7 318-326. 2003.
- NAGAYAMA, Y.; KAUFMAN, K.D.; SETO, P.; RAPOPORT, B. Molecular cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 65 (3):1184-90. 1989.
- NAGASHIMA, T.; MURAKAMI, M.; ONIGATA, K.; MORIMURA, T.; NAGASHIMA, K.; MORI. M. Novel inactivating missense mutations in the thyrotropin receptor

gene in Japanese children with resistance to thyrotropin. *Thyroid* 11:551-9. 2001.

NUPAD-UFMG. Cartilha Informativa do Núcleo de Pesquisa e Apoio ao Diagnóstico da Universidade Federal de Minas Gerais. 1999.

PARK, S.M. & CHATTERJEE, V.K.K. Genetics of congenital hypothyroidism. *J. Med. Genet.*42;379-389. 2004.

PERONE, D. ; TEIXEIRA, S.S.; CLARA, S.A; SANTOS, D.C.; NOGUEIRA, C.R. Aspectos Genéticos do Hipotireoidismo Congênito. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol 48 nº 1 Fevereiro 2004.

Portaria SAS/MS nº 848, de 31 de outubro de 2002. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas.

PALOS, F; O PEREZ, V ALVAREZ-IGLESIAS, J CAMESELLE, F BARREIRO, D ARAUJO, R ARGUESO, M BOTANA, JM CABEZAS, L DOMINGUEZ, T MARTINEZ, J NUÑO, JC RUEDA & J LADO-ABEA. Study of the prevalence and mechanisms of action of TSH receptor and Gs protein alfa-subunit mutations, in toxic multinodular goiter and toxic adenoma from Galicia (Spain). *Endocrine Abstracts* 11: P809. 2006.

RAMOS HE, NESI-FRANÇA S, BOLDARINE VT, PEREIRA RM, CHIAMOLERA MI, CAMACHO CP, GRAF H, DE LACERDA L, CARVALHO GA, MACIEL RM. Clinical and molecular analysis of thyroid hypoplasia: a population-based approach in southern Brazil. *Thyroid*. Jan;19(1):61-8. 2009.

REFETTOFF, S.; DUMONT, J.; VASSAT, G. Thyroid Disorders. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8a edição, 4029 - 4075. 2001.

ROYAUX, I.E.; SUZUKI, K.; MORI, A.; KATOH, R.; EVERETT, L.A.; KOHN, L.D. Pendrin, the protein encoded by the Pendred Syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 Cells. *Endocrinology* 141: 839. 2000.

- REFETOFF, S.; WEISS, R.E.; USALA, S.J. The syndromes of resistance to thyroid hormone. *Endocr Rev* 14:348-99. 1993.
- RÚBIO, I.G.S.; KNOBEL, M.; NASCIMENTO, A.C.; SANTOS, C.L.; TONIOLO, NETO, G.M. Hipotireoidismo congênito: recentes avanços em genética molecular. *Arq bras endocrinol metab* vol 46 n4 agosto, 2002.
- RUSSO, D.; BETTERLE, C.; ARTURI, F.; CHIEFARI, E.; GIRELLI, M.E.; FILETTI, S. A novel mutation in the thyrotropin (TSH) receptor gene causing loss of TSH binding but constitutive receptor activation in a family with resistance to TSH. *J Clin Endocrinol Metab.* 85(11):4238-42. 2000.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIAATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor, 1-626p. 1989.
- SBEM: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Hipotireoidismo Congênito. Projeto diretrizes. 2005. Disponível em: <http://www.projetodiretrizes.org.br/4_volume/18-Hipotiroid.pdf> Acesso em: 10 de setembro de 2009.
- SERRANO, E.P.; BARROSO, V.M.; ESTRADA, N.C. Bases moleculares del hipotiroidismo congénito. *Bol Med Hosp Infant Mex.* Vol. 63, septiembre-octubre 2006.
- SETIAN, N. Hypothyroidism in children: Diagnosis and treatment. *Jornal de Pediatria* - Vol. 83, No. 5(Suppl), 2007.
- SILVA, L.O.; DIAS, V.M.A.; SILVA, I.N.; CHAGAS, A.J. Hipotireoidismo congênito transitório: Perfil das crianças identificadas no Programa Estadual de Triagem Neonatal do Estado de Minas Gerais. *Arq Brás Endocrinol Metab*, v, 49, n4, p 521-528, 2005.

- STEIN S.A, OATES E.L, HALL CR, GRUMBLES RM, FERNANDEZ L.M, TAYLOR N.A, PUTT D. and JIN S Identification of a point mutation in the thyrotropin receptor of the hyt/hyt hypothyroidism mouse. *Mol Endocrinol*; 8:129-38; 1994.
- SYKIOTIS, G.P.; NEUMANN, S.; GEORGOPOULOS, N.A.; SGOUROU, A.; PAPACHATZOPOULOU, A.; MARKOU, K.B.; KYRIAZOPOULOU, V.; PASCHKE, R.; VAGENAKIS, A.G.; PAPAVALASSILOU, A.G. Functional significance of the thyrotropin receptor germline polymorphism D727E *Biochem Biophys Res Commun.* 21;301(4):1051-6. 2003.
- SUNTHORNTHEPVARAKUL T, GOTTSCHALK M.E, HAYASHI Y. AND REFETOFF S.; Resistance to thyrotropin caused by mutations in the thyrotropin-receptor gene; *The New England Journal of Medicine.* Vol. 332 No. 3, p 155-60. 1995.
- THEILER, K. *The House Mouse, atlas of embryonic Development.* New York, Springer-Verlag, 1989.
- TAHIROVIC, H. & TOROMANOVIC, A. Clinical presentation of primary congenital hypothyroidism: experience before mass screening. *Bosn J Basic Med Sci.* 4: 26-29. 2005.
- TIOSANO, D.; PANNAIN, S.; VASSART, G.; PARMA, J.; GERSHONI-BARUCH, R.; MANDEL, H. The hypothyroidism in an inbred kindred with congenital thyroid hormone and glucocorticoid deficiency is due to a mutation producing a truncated thyrotropin receptor. *Thyroid* 9:887-94. 1999.
- TONACCHERA M, CETANI F, COSTAGLIOLA S, VAN SANDE J, REFETOFF S, VASSART G. Functional characteristics of a variant thyrotropin receptor. *Eur J Biochem* 238:490–494. 1996.
- TONACCHERA, M.; AGRETTI, P.; PINCHERA, A.; ROSELLINI, V.; PERRI, A.; COLLECCHI, P. Congenital hypothyroidism with impaired thyroid response to thyrotropin (TSH) and absent circulating thyroglobulin: evidence for a new inactivating mutation of the TSH receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1001-8. 2000.

TONACCHERA, M.; AGRETTI, P.; DE MARCO, G.; PERRI, A.; PINCHERA, A.; VITTI, P.; CHIOVATO, L. Thyroid Resistance to TSH Complicated by Autoimmune Thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 4543-4546; 2001.

WU, J.Y.; SHU, S.G.; TANG, C.F.; LEE, C.C.; and TSAI, F.J. Mutation analysis of thyroid peroxidase gene in Chinese patients with total iodide organification defect: identification of five novel mutations. *Journal of Endocrinology* ;172, 627–635; 2002.

VULSMA, T. & DE VIJLDER, J.J.M. Thyroid disease in newborns, infants and children. In *Oxford Textbook of Endocrinology and Diabetes* (Wass, J.A. and Shalet, S.M., eds), pp. 532-544, Oxford University Press. 2002.

YUAN ZF, MAO HQ, LUO YF, WU YD, SHEN Z, ZHAO ZY. Thyrotropin receptor and thyroid transcription factor-1 genes variant in Chinese children with congenital hypothyroidism. *Endocr J.* May;55(2):415-23. 2008.

ZANNINI, M.; AVANTAGGIATO, V.; BIFFALI, E.; ARNONE, M.I.; SATO, K.; PISCHETOLA, M.; TAYLOR, B.A.; PHILIPS, S.J.; SIMEONE, DI LAURO, R. TTF2 , a new forkheade protein, shows a temporal expressão in developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *The EMBO Journal* vol.16, no 11 pp.3185-3197, 1997.

ZAKARIJA, M.; MCKENZIE, JM, EIDSON, MS. Transient neonatal hypothyroidism: characterization of maternal antibodies to the thyrotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab*; 70:1239-46,1990.

ZHEING Liu *et al.* A novel TSHR gene mutation (Ile691Phe) in a Chinese family causing autosomal dominant non-autoimmune hyperthyroidism. *The Japan Society of Human Genetics and Springer.* 53:475–478;2008.

http://www.endonutri.med.br/portal/artendocrino0009_img_01. Acessado em 30 de julho 2009.

http://www.endonutri.med.br/portal/artendocrino0009_img_02. Acessado em 30 de julho de 2009.

http://www.ogruppo.org.br/glandula_tireoide_paratiroides. Acessado em 15 de agosto de 2009.

<http://www.sistemanervoso.com/pagina.68&materiaver>. Acessado em 10 de setembro de 2009.

ANEXO I**GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ
FUNDAÇÃO SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DO PARÁ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****TERMO DE APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética em Pesquisa analisou no dia 08 de novembro de 2005 o projeto de pesquisa intitulado "ANÁLISE BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO NO ESTADO DO PARÁ" de autoria do discente ERIK ARTHUR CORTINHAS ALVES, Orientado pelo prof. Dr. LUIZ CARLOS SANTANA DA SILVA, obtendo **APROVAÇÃO** com autorização para desenvolver – lo na Universidade Federal do Pará.

Belém, 13 de dezembro de 2005.

Assinatura manuscrita de Dra. Simone Conde, com uma data "13/12/05" escrita no meio da assinatura. O texto "Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa" é visível no fundo da assinatura.

Dra. SIMONE CONDE

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da FSCMP

ANEXO II



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

INFORMAÇÕES PARA OS PAIS OU RESPONSÁVEIS LEGAIS

TÍTULO DO ESTUDO:

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE DO RECEPTOR DE TIREOTROFINA EM
PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO**

O QUE É O HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO

A tireóide é uma glândula endócrina importantíssima para o bom funcionamento do nosso corpo. Os hormônios produzidos por ela, T_4 (tiroxina) e T_3 (triiodotironina) estimulam o metabolismo, isto é, o conjunto de reações necessárias para assegurar todos os processos bioquímicos do organismo.

Os principais distúrbios da tireóide são o hipotireoidismo (baixa ou nenhuma produção de hormônios) e o hipertireoidismo (produção excessiva de hormônios), doenças que incidem mais nas mulheres do que nos homens.

QUAIS AS CONSEQUÊNCIAS DESSA DOENÇA?

No **recém-nascido**, ocorre: choro rouco, apatia, diminuição de reflexos, pele seca, dificuldade de desenvolvimento e problemas neurológicos.

Se o paciente não receber tratamento adequado até a quarta semana de vida, pode ocorrer retardo mental severo, surdez, e retardo no desenvolvimento de peso e altura.

A doença predomina no sexo feminino, no qual ocorre também irregularidade menstrual, incluindo a cessação da menstruação (amenorréia), infertilidade e galactorréia (aparecimento de leite nas mamas fora do período de gestação e puerpério).

COMO O MÉDICO FAZ O DIAGNÓSTICO?

No **recém-nascido**, deve ser realizada a triagem neonatal através da dosagem de T_4 ou TSH em papel filtro. Se essas dosagens forem alteradas, o exame deve ser confirmado com os mesmos procedimentos no sangue e, se alterados, iniciar de imediato o tratamento.

COMO SE TRATA?

O tratamento de todas as formas de hipotireoidismo é realizado através da reposição dos hormônios que a tireóide não está produzindo (Tiroxina ou T₄). O controle do tratamento é realizado pela dosagem de TSH, que deve se manter sempre em um padrão normal.

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

O objetivo desse estudo é identificar a causa genética (Mutações e Polimorfismo – alterações no DNA) responsável pelo aparecimento do Hipotireoidismo Congênito no seu filho, sendo este exame o diagnóstico molecular (diagnóstico definitivo) que mostra as alterações genéticas que levaram à não produção dos hormônios da tireóide, nas pessoas com hipotireoidismo que foram detectados pelo teste do pezinho.

COMO E ONDE ESTE ESTUDO SERÁ REALIZADO?

Deverão participar deste estudo pacientes do Estado do Pará. Os pacientes selecionados serão solicitados a fornecer informações sobre sua história médica. Se você permitir, estas informações poderão ser obtidas através do seu médico ou de registros médicos hospitalares. Os pacientes que estiverem comparecendo à consulta de retorno serão convidados a participar deste estudo quando será realizado o seguinte procedimento:

- **Coleta de sangue** (5 a 10mL). O material coletado será processado e analisado nos Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo e Laboratório de Genética Humana e Médica, ambos da Universidade Federal do Pará, para identificar as mutações causadoras da doença.

QUAIS OS RISCOS DESTE ESTUDO?

A coleta de sangue poderá causar um desconforto temporário por causa da picada de agulha, hematoma e raramente, infecção.

QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS DESTE ESTUDO?

Como esse diagnóstico, poderá ser possível estabelecer correlação com a gravidade da doença e, com isso, oferecer melhor tratamento, isto é, ajustar a reposição hormonal de acordo com a gravidade das mutações detectadas pelo estudo molecular, ou seja, de acordo com as mutações detectadas, se mais ou menos graves, permitir uma reposição hormonal mais ou menos rigorosa. Além disso, para as famílias interessadas, este estudo pode ser oferecido para encontrar pessoas portadoras da mutação, ou seja, identificar pessoas da mesma família que têm o risco de ter um filho com Hipotireoidismo Congênito.

POSSO RECUSAR A PARTICIPAÇÃO?

Seu filho não é obrigado a participar deste estudo. A sua participação neste estudo é voluntária. A recusa em participar não terá conseqüências para os seus cuidados presentes e futuros. Seu filho poderá se retirar do estudo a qualquer momento. Os médicos do estudo podem decidir para o estudo ou não permitir a participação de seu filho se isto for do seu melhor interesse.

TENHO QUE PAGAR PARA PARTICIPAR?

Não há nenhum custo para participar dessa pesquisa. Seu filho não será pago para participar deste estudo.

E SE EU / MEU FILHO FOR PREJUDICADO?

O Dr. Luiz Carlos Santana da Silva deverá ser notificado se você suspeitar que seu filho foi prejudicado por estar no estudo.

AS INFORMAÇÕES SOBRE MEU FILHO SE TORNARÃO PÚBLICAS?

A identidade de seu filho e outras informações pessoais obtidas neste estudo serão confidenciais. Informações científicas e médicas obtidas neste estudo, das quais a identidade de seu filho não poderá ser revelada, deverão ser apresentadas em encontros e publicadas a fim de tornar as informações obtidas neste estudo de benefício para os outros.

COM QUEM POSSO TIRAR DÚVIDAS?

Você está livre para fazer perguntas sobre estudo clínico a qualquer momento. Quando você tiver dúvidas relacionadas a este estudo, poderá falar com:

- Dr. Luiz Carlos Santana da Silva
- Dra. Milena Coelho Fernandes Caldato
- Mestrando Clebson Pantoja Pimentel

Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo

Universidade Federal do Pará

Instituto de Ciências Biológicas

Av. Augusto Correa, 01, Bairro Guamá, CEP. 666075-900 Belém-Pa

Telefone: 3183-2030 – e-mail: lcss@ufpa.br

ANEXO III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____ manifesto meu consentimento com envolvimento do meu filho no projeto de pesquisa intitulado:

1. A natureza e objetivo do projeto de pesquisa, descritos na folha de informação em anexo, foram explicadas a mim. Eu compreendo e concordo em participar.
2. Eu compreendo que meu filho poderá não ter benefício direto por participar do estudo
3. Eu entendo que os possíveis riscos e/ou efeitos adversos, desconforto e inconveniências, como foi destacado na folha de informações, foram explicadas a mim.
4. Eu compreendo que, apesar das informações obtidas no estudo poderem ser publicadas, elas serão confidenciais e meu filho não será identificado a partir delas.
5. Eu compreendo que posso retirar meu filho do estudo em qualquer etapa e que isto não irá afetar os cuidados médicos ou quaisquer outros aspectos da relação recebidos ao meu filho.
6. Eu compreendo que não haverá pagamento para meu filho por participar deste estudo.
7. Eu tive a oportunidade de discutir a participação de meu filho neste projeto de pesquisa com um membro da família ou amigo e/ou tive a oportunidade de ter um membro da família ou amigo presente enquanto o projeto de pesquisa estava sendo explicado pelo pesquisador.
8. Eu estou ciente de que devo guardar uma cópia do Termo de Consentimento, quando completo, e da folha de Informações.
9. Eu concordo que o material (sangue) coletado de meu seja utilizado no projeto acima.

Assinatura do Responsável: _____

Relação de parentesco com o paciente: _____

Nome completo do paciente: _____

Data: __ / __ / __

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](#)