



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA – UEPB
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
LICENCIATURA PLENA E BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ALANNE RAYSSA DA SILVA MELO

**GENOTIPAGEM DE MICROSSATÉLITE NO GENE TPO EM PACIENTES COM
HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO**

CAMPINA GRANDE – PB
2012

ALANNE RAYSSA DA SILVA MELO

Genotipagem de microssatélite no gene TPO em pacientes com Hipotireoidismo Congênito

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Licenciatura e bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dr^a. Simone Silva dos Santos Lopes

CAMPINA GRANDE – PB
2012

M528g Melo, Alanne Rayssa da Silva.
Genotipagem de microssatélite no gene TPO em
pacientes com Hipotireoidismo Congênito
[manuscrito] / Alanne Rayssa da Silva Melo. – 2012.
55 f. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em
Biologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro
de Ciências Biológicas e da Saúde, 2012.

“Orientação: Profa. Dra. Silvana Cristina Santos,
Departamento de Biologia”

1. Hipotireoidismo. 2. Hipotireoidismo Congênito.
3. Endocrinologia. 4. Pediatria. I. Título.

21. ed. CDD 616.444

ALANNE RAYSSA DA SILVA MELO

**GENOTIPAGEM DE MICROSSATÉLITE NO GENE TPO EM
PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO**

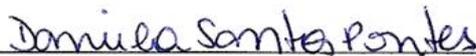
Orientadora: Prof. Dr^a. Simone Silva dos Santos Lopes

Campina Grande, 27 de Junho de 2012.
NOTA 9,8 (nove vírgula oito)

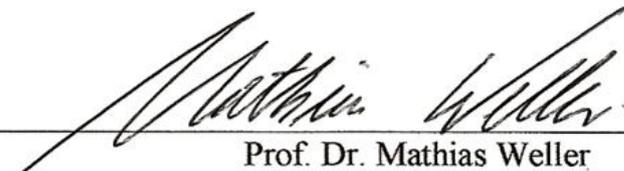
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dra. Simone Silva dos Santos Lopes
Universidade Estadual da Paraíba – UEPB Campus I



Prof.^a Dra. Daniela Pontes Santos
Universidade Estadual da Paraíba – UEPB Campus V



Prof. Dr. Mathias Weller
Universidade Estadual da Paraíba – UEPB Campus I

*Aos meus pais, pelo amor,
compreensão e estímulo em
todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus. Não existe descrição nem agradecimento suficiente para sua atuação em minha vida;

Aos Meus pais Arnaud Filho e Crisonete Melo, por compartilharem os meus ideais e os investirem, incentivando-me a prosseguir nesta jornada, pelos grandiosos ensinamentos que fizeram de mim a pessoa de hoje e pelo laço de amor que nos une;

Meus irmãos Amanda Raylla, Arnaud Neto (netinho) e Raquel Alexandre, pela verdadeira amizade que cultivamos, pelo amparo em todos os momentos e por estarmos sempre juntos;

Ao meu namorado André Luiz pelo imenso carinho e companheirismo, por respeitar profundamente a minha maneira de ser, apoiando-me em meus ideais mesmo que para isso fiquemos separados e pelos ótimos momentos que temos passados juntos;

Aos professores Valéria, Dilma, André, Ana Paula, Avany, Farias, Josemar, Abraão, Valberto, Humberto, Alessandra, Márcia, Cibele, Márcio, Roberta, Iranildo, Livânia, Walclércio, Matias e Simone por terem me mostrado, com muita ética o caminho da ciência, pela orientação, pela contribuição imensurável durante a minha formação acadêmica e pessoal e, principalmente, pela amizade e o respeito que temos. Vocês são pessoas incríveis! A todos do Laboratório BIOMOL, especialmente à Wellison, Yonara, Francisco e Guia por terem aberto as portas do laboratório para o desenvolvimento desse trabalho e, principalmente, pela amizade. As “meninas da genética”, Rayane, Camila, Allane, Larissa, Mayara₁, Mayara₂, Thuany, Cláudia, Liliane, Tafnys e ao único “Y” do grupo, Alisson, por todos os bons momentos dentro e fora do laboratório, por todo o apoio na pesquisa e pela grande amizade, que a cultivemos sempre. Vocês são muito especiais!

Aos pacientes e controles pela gentileza ao doar as amostras para o estudo.

A todos vocês, que amo imensamente, a minha gratidão e o meu reconhecimento, pois nos méritos desta conquista há muito de vossas presenças:

Otonilson, Amonikele, Kethely, Romilda, Taciano, Claudiane, Ákila, Raquel, Bruno's, Patrick, Emanuel, Janyely, Alisson, Adson, Jacqueline, Franklyn, Jamerson e Judith;

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Simone Silva dos Santos Lopes, excelente pessoa e profissional, na qual eu me espelho e sou imensamente grata por acreditar em mim, confiando-me o projeto.

A banca examinadora pela colaboração científica na pesquisa, pela gentileza e disponibilidade.

A Universidade Estadual da Paraíba e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela presença nesses quatro anos de curso e pelo apoio financeiro.

“O acaso é talvez, o pseudônimo que Deus usa quando não quer assinar suas obras”.

T. Gauthier

“Para os crentes, Deus está no princípio das coisas. Para os cientistas, no final de toda reflexão”.

Max Planck

RESUMO

O Hipotireoidismo Congênito (HC) é um dos distúrbios endócrinos pediátricos mais comuns, ocorrendo em aproximadamente 1/3000-4000 nascimentos. Quando a população não dispõe de programas de detecção neonatal, o HC chega a constituir a causa mais comum de retardo mental prevenível. Esta síndrome é ocasionada pela deficiência ou ausência dos hormônios tireoideanos (HTs). O HC se encontra associado ao defeito na formação dos hormônios tireoideanos (disormonogênese) em 10 - 15% dos pacientes. Os outros 85% dos casos estão associados à problemas no desenvolvimento da glândula (disgenesia). A Tireoperoxidase (TPO) é uma enzima importante para a síntese dos hormônios da tireóide. Mutações inativadoras desse gene levam a defeitos de organificação de iodeto. Os microssatélites ou STRs são marcadores moleculares caracterizados por repetições em tandem de 1 a 6 nucleotídeos. O microssatélite HumTPO (AATG)_n, está localizado no íntron 10 do gene TPO. O presente trabalho teve como objetivo analisar a interação entre o STR HumTPO e o Hipotireoidismo Congênito por disormonogênese através da verificação de possíveis alelos específicos em pacientes com HC, além de inferir sobre a variabilidade genética presente na população estudada. Também foi analisada a transmissão mendeliana do microssatélite nos casos familiares dos pacientes a fim de verificar se existem alelos específicos em cada família. A amostra é composta de 25 pacientes com HC por disormonogênese e 22 controles oriundos da 2ª macrorregião de saúde do estado da Paraíba. O marcador foi analisado em gel desnaturante de poliacrilamida. Foram observados um total de sete alelos para o marcador HumTPO e heterozigosidade de 0,6875. Não foi encontrado diferença significativa entre as frequências alélicas de pacientes e controles. Os dados mostram que não existe relação entre a disormonogênese e os alelos do STR HumTPO. A população estudada se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg e apresenta uma grande diversidade genética para o loco HumTPO em relação ao estado, região e país.

PALAVRAS-CHAVE: Hipotireoidismo Congênito, Microssatélite HumTPO, Paraíba.

ABSTRACT

The Congenital Hypothyroidism (CH) is one of the most common pediatric endocrine disorders, occurring in approximately 1/3000-4000 births. When the population has no neonatal screening programs, the HC comes to be the most common cause of preventable mental retardation. This syndrome is caused by a deficiency or absence of thyroid hormones (THs). The HC is associated with the defect in the formation of thyroid hormones (dyshormonogenesis) in 10-15% of patients. The other 85% of cases are associated with problems in the development of the gland (dysgenesis). The thyroperoxidase (TPO) is an important enzyme for the synthesis of thyroid hormones. Inactivating mutations of this gene lead to defects in iodide organification. Microsatellites or STRs markers are characterized by tandem repeats 1-6 nucleotides. The microsatellite HumTPO (AATG)_n is located in intron 10 of the TPO gene. This study aimed to analyze the interaction between the STR and Congenital Hypothyroidism HumTPO dyshormonogenesis by checking for possible specific alleles in patients with HC, as well as infer the genetic variability present in the population studied. Was also analyzed in transmission mendelian microsatellite familial cases of patients in order to check for specific alleles in each family. The sample consisted of 25 patients with HC by dyshormonogenesis and 22 controls from the 2nd macroregion health of the state of Paraíba. The marker was analyzed by denaturing polyacrylamide gel. Were seen a total of seven alleles HumTPO and the marker heterozygosity of 0.6875. No significant difference was found between the allele frequencies of patients and controls. The data show that there is no relationship between the dyshormonogenesis and HumTPO alleles of the STR. The study population is in Hardy-Weinberg balance and presents a high genetic diversity for the locus HumTPO towards the state, region and country.

KEYWORDS: Congenital Hypothyroidism, microsatellite HumTPO, Paraíba.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Desenvolvimento da glândula tireóide, genes expressos e correlação fenótipo com genótipo mutado	16
Tabela 2 – Etiologia do hipotireoidismo congênito	23
Tabela 3 – Estudos na literatura sobre a incidência de Hipotireoidismo Congênito em diferentes etnias	25
Tabela 4 – Caracterização dos marcadores moleculares mais utilizados em genética de populações com suas principais características	26
Tabela 5 – Tabela de frequências mostrando a distribuição genotípica nos diferentes grupos estudados	37
Tabela 6 – Resultados da genotipagem em pacientes e controles.....	38
Tabela 7 – Frequências alélicas do STR HumTPO no Brasil e em diferentes regiões sociogeográficas brasileiras	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –Frequências alélicas totais	36
Gráfico 2 – Frequências alélicas encontradas em pacientes e controles	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Esquema representativo da biossíntese dos hormônios tireoidianos e principais vias de sinalização nas células foliculares	17
Figura 2 – Regulação da síntese e secreção dos hormônios da tireóide - Eixo hipotalâmico-hipofisário-tiroideu	18
Figura 3 – Esquema do gene TPO com todas as mutações relatadas até o momento	20
Figura 4 –Criança com hipotireoidismo congênito	21
Figura 5 – Densidade de cada tetranucleotídeo por cromossomo no genoma humano.....	28
Figura 6 – Mecanismo de formação de STR através do escorregamento da DNA polimerase durante a replicação.....	29
Figura 7 - Ilustração mostrando a estrutura do <i>Short Tandem Repeat</i> (STR) HumTPO.....	30
Figura 8 – Mapa do estado da Paraíba mostrando as quatro macrorregiões de Saúde	32
Figura 9 – Perfil eletroforético de alelos do STR HumTPO	35
Figura 10 – Gel de poliacrilamida (6%) contendo uréia (7M) mostrando a presença do alelo 6 encontrada em apenas um paciente	37
Figura 11 – Heredograma da família 1 da nossa amostra apresentando 3 casos de Hipotireoidismo congênito	38
Figura 12 – Heredograma da família 2 da nossa amostra com 4 casos de Hipotireoidismo congênito estudados	39
Figura 13 – Heredograma da família 3 da nossa amostra, apresentando 2 casos de Hipotireoidismo congênito	40

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados

DIT – Diiodotirosina

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DT – Disgenesia tireoidiana

HC – Hipotireoidismo congênito

He – Heterozigosidade esperada

Ho – Heterozigosidade observada

HP – Hipotireoidismo primário

HTs – Hormônios tireoideanos

HUAC – Hospital Universitário Alcides Carneiro

HWE – Equilíbrio de Hardy-Weinberg

MIT – Monoiodotirosina

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PIOD – Defeito parcial na organificação do iodeto

PNTN – Programa Nacional de Triagem Neonatal

RAPD – Amplificação randômica de DNA polimórfico

RFLP – Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

SNPs – Polimorfismo de nucleotídeo simples

STRs – Repetições curtas em tandem

TG – Tireoglobulina

TIOD – Defeito total na organificação do iodeto

TPO – Tireoperoxidase

TRH – Hormônio liberador de tirotrófina

TSH – Hormônio tireo-estimulante

VNTRs – Variável número de repetições em tandem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 A glândula tireóide	15
2.1.1 Biossíntese dos hormônios tireoidianos (HTs)	16
2.2 A tireoperoxidase	19
2.3 O hipotireoidismo congênito	20
2.3.1 Classificação e etiologia do HC	22
2.4 Genética de populações.....	23
2.4.1 Marcadores moleculares	25
2.4.2 Microssatélites	27
2.4.3 O STR HumTPO.....	30
2.5 Objetivos.....	31
2.5.1 Geral.....	31
2.5.2 Específicos	31
3. METODOLOGIA	32
3.1 Local do estudo e amostragem	32
3.2 Coleta e extração de DNA genômico	33
3.3 Amplificação e genotipagem das amostras	33
3.4 Análise dos resultados.....	34
4. RESULTADOS	35
4.1 Frequências alélicas do STR HumTPO.....	35
4.2 Frequências genotípicas do STR HumTPO	37
4.3 Segregação do microssatélite nas famílias estudadas	38
4.4 Frequências alélicas do STR HumTPO na população brasileira	40
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	44
7. PERSPECTIVAS	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

O Hipotireoidismo Congênito (HC) é um dos distúrbios endócrinos pediátricos mais comuns, ocorrendo em aproximadamente 1/3000-4000 nascimentos (DELANGE, 1997). Quando a população não dispõe de programas de detecção neonatal a fim de estabelecer o diagnóstico e tratamentos oportunos, o HC chega a constituir a causa mais comum de retardo mental prevenível. O Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), Teste do Pezinho tem grande relevância na identificação precoce do paciente em um estágio pré-sintomático, através da medição dos níveis séricos do TSH (LAFRANCHI, 1995).

Esta síndrome é ocasionada pela deficiência ou ausência dos hormônios tireoideanos que, dependendo do grau e da duração da deficiência, pode afetar os tecidos em maior ou menor proporção, promovendo assim um retardo nos processos metabólicos. Os maiores danos ocorrem durante a vida uterina, visto que, os hormônios da tireoide são essenciais no desenvolvimento cerebral do feto nos primeiros meses de gestação (OLIVEIRA, 2009).

Segundo CASTANET *et al.* (2001), o HC se encontra associado ao defeito na formação dos hormônios tireoideanos T₃ e T₄ (disormonogênese) em 10 - 15% dos pacientes. Os outros 85% dos casos estão associados à disgenesia, que são problemas no desenvolvimento da glândula. O retardo mental está associado à condição do prognóstico tardio do HC e o tratamento prematuro previne não apenas o dano cerebral devido ao déficit de hormônios tireoídeos, como também o desenvolvimento incompleto do sistema esquelético, macroglossia além de outros problemas como hipotonia, mixedema, distensão abdominal, septo nasal incompleto, hipotermia e hérnia umbilical (WEBER *et al.* 2000).

A Tireoperoxidase (TPO) é uma enzima importante para a síntese dos hormônios da tireoide, e seus defeitos são considerados como causas prevalentes de erros no metabolismo da glândula. Erros congênitos na TPO geralmente são transmitidos por herança autossômica de caráter recessivo (RIS-STALPERS & BIKKER, 2010). Mutações inativadoras desse gene levam a defeitos de organificação total ou parcial de iodeto (TURKKAHRAMAN *et al.*, 2010).

Levando em consideração o relevante papel fisiológico que a TPO desempenha na função da tireoide (TAUROG 1991), é possível investigar a presença de alelos que possam estar envolvidos diretamente na sua função catalítica, ou ainda, que sirvam de marcadores moleculares em pacientes com disormonogênese. Alguns estudos sugerem que a ampla variação geográfica do HC possa ter relação com a base molecular de sua patogênese. Para suprir essa lacuna, são necessários estudos em uma ampla variedade de populações humanas,

mas esses estudos têm sido realizados em um pequeno número de grupos regionais e raramente levam em consideração a etiologia da doença (JORDAN *et al.*, 2003; TENENBAUM-RAKOVER *et al.*, 2007).

Os microssatélites ou *Short Tandem Repeats* (STRs) são marcadores moleculares caracterizados por repetições em tandem de 1 a 6 nucleotídeos, amplamente distribuídos no genoma humano. A grande maioria dos locos de microssatélites está presente em regiões não-codificantes, sendo seletivamente neutros (WREN *et al.*, 2000), porém, uma parte significativa destas sequências, quando presentes em regiões codificantes ou regulatórias, são funcionalmente importantes para alguns processos biológicos e, mesmo em regiões não codificantes, podem estar ligados a locos codificantes, sofrendo então os efeitos da seleção natural (LEITE, 2006).

Os marcadores STRs têm sido amplamente utilizados em diferentes áreas como genética de populações, investigação de parentesco e análises forenses, pois, além de apresentarem grande heterozigosidade, dispersão uniforme, alto nível de reprodutividade e codominância, eles possibilitam a genotipagem por métodos rápidos e simples. O microssatélite HumTPO (AATG)_n, está localizado no íntron 10 do gene TPO e tem sido descrito como altamente polimórfico ANKER *et al.* (1992).

Uma abordagem possível para a identificação de fatores genéticos que contribuem para a patogênese do HC é o estudo de associação entre marcadores polimórficos. Estes marcadores podem representar uma ferramenta poderosa para a identificação de locus de susceptibilidade, mesmo que eles não representem o locus da doença em si. Indícios desses locus podem ocorrer, quando determinado alelo (ou genótipo) do marcador estudado é encontrado com maior frequência em uma população de pacientes do que na população em geral, principalmente na existência de co-segregação da doença com os alelos no marcador dentro das famílias (GREENBERG, 1993).

Sendo o Hipotireoidismo Congênito (HC) uma das maiores causas de retardo mental grave prevenível, é imprescindível a realização de estudos de caracterização molecular dos genes envolvidos na biossíntese dos hormônios da tireóide. O estudo possibilitará a verificação da frequência alélica e análise do genótipo do STR HumTPO em controles e pacientes com disormonogênese na população paraibana e relacionar os dados obtidos com a frequência deste microssatélite na população paraibana (GOMES *et al.*, 2007), oferecendo informações à cerca da variabilidade genética da nossa amostra. A relevância deste estudo se encontra na análise da interação entre o marcador e o Hipotireoidismo Congênito através da verificação de possíveis alelos específicos nos pacientes com HC.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A glândula tireóide

A tireóide é a primeira glândula endócrina a surgir durante o desenvolvimento fetal (a partir do 22º dia). Está localizada no pescoço anterior entre as vértebras C5 e T1. Pesando cerca de 15-30 g, a glândula é recoberta pelos músculos do pescoço e suas respectivas fáscias (MOORE, 2004).

A unidade funcional básica da glândula são os folículos, estes são constituídos por uma camada externa de células cuboides circundadas pela membrana basal rodeando um material amorfo chamado colóide. Este material armazena uma glicoproteína de elevado peso molecular (660 kDa) chamada Tireoglobulina (TG), sintetizada pelas células da tireóide e secretada para o lúmen pelo folículo. A Tireoglobulina contém aproximadamente 110 resíduos do aminoácido, constituindo a unidade base para formação dos hormônios tireoidianos (HTs). (MEDEIROS-NETO & KNOBEL, 1992).

A glândula tem como função principal, a produção dos hormônios 3,5,3' triiodotironina (T₃) e 3,5,3',5' tetraiodotironina (T₄) pelas células foliculares, sendo também responsável pela produção de calcitonina (pelas células parafoliculares) (MAUCHAMP *et al.*, 1998). A glândula é bastante vascularizada e rica em capilares sanguíneos e linfáticos. Macroscopicamente é composta por dois lobos unidos por um istmo e revestidos por uma cápsula conjuntiva (FAGMAN *et al.*, 2006).

A tireóide obtém sua forma definitiva entre a 8ª ou 9ª semana de gestação (PARK & CHATTERJEE, 2005) e é composta por células de duas origens embrionárias diferentes, são elas: as células foliculares tireoidianas (CFT) e as células parafoliculares (células C). O primórdio tireoidiano é formado durante a quarta semana de gestação, a partir de um espessamento da epiderme localizado na base da língua, que posteriormente migra originando o parênquima tireoidiano composto pelas células foliculares (FAGMAN & NILSSON, 2010). Evidências sugerem que os fatores de transcrição TITF-1, TITF-2 e PAX-8 são indispensáveis à evolução glandular, seja do ponto de vista migratório como proliferativo (KAMBE & SEO, 1997) (Tabela 1). Os mecanismos que estimulam a proliferação dos precursores da glândula ainda não são conhecidos.

Tabela - 1 Desenvolvimento da glândula tireóide, genes expressos e correlação fenótipo com genótipo mutado.

A	Organogênese		Células primordiais indiferenciadas	Migração	Proliferação das células precursoras	Diferenciação funcional	Expansão das células diferenciadas
B	Expressão Gênica	TTF1	+	+	+	+	+
		TTF2	+	+	+	+	+
		PAX-8	+	+	+	+	+
		TSHR	-	-	+	+	+
		TG, TPO	-	-	-	+	+
C	Fenótipo esperado na ausência de expressão dos genes acima		Agenesia	Agenesia Ectopia	Agenesia	Bócio Hipoplasia	Hipoplasia
D	Mutações descritas relacionadas ao fenótipo		-	PAX-8	TTF2	TSHR, PAX-8 TG, TPO	TSHR PAX-8

Agenesia: ausência da glândula tireóide; Ectopia: glândula localizada fora da sua topografia habitual, ocorre na ausência da migração; Bócio: aumento do volume da glândula tireóide. (Fonte: PERONE *et al.*, 2004).

2.1.1 Biossíntese e regulação dos hormônios tireoidianos (HTs)

Os HTs tem como função regular o consumo energético e são indispensáveis para o crescimento, desenvolvimento e maturação de vários órgãos. Entre outras funções destacam-se o estímulo da frequência cardíaca, da síntese protéica e do metabolismo glicídico, além do aumento da síntese e degradação do colesterol e triglicerídeos, e potencialização da sensibilidade aos receptores β -adrenérgicos às catecolaminas (WHITLEY *et al.*, 1996 *apud* MEZALIRA, 2010, p.3).

O processo de síntese dos hormônios tireoideanos inicia-se a partir do estímulo do TSH (hormônio tireo-estimulante), sintetizado na hipófise anterior (Figura 1). O TSH liga-se ao seu receptor (TSHR) localizado na membrana basolateral do tireócito. No trato gastrointestinal o iodo (I_2) é transformado em iodeto (I) que é rapidamente absorvido pela corrente sanguínea e incorporado na membrana tireoidiana por transporte ativo através do simportador de sódio e iodeto (NIS) (DE LA VIEJA *et al.*, 2000). O transporte do iodeto para o colóide, através da membrana apical, é realizado através do transportador chamado pendrina (PDS) (RODRIGUEZ *et al.*, 2002).

A oxidação do iodeto é uma importante etapa no processo de hormonogênese e é feito no lúmen da membrana pela tireoperoxidase (TPO) na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gerado por um complexo sistema de NADPH oxidases: DUOX-1 e DUOX-2 (DE DEKEN *et al.*, 2000;). A enzima TPO também é responsável pela ligação do

iodeto nos resíduos de tirosina da tireoglobulina (TG) dando origem às iodotirosinas MIT (monoiodotirosina) e DIT (diiodotirosina). Uma molécula de DIT e uma de MIT se ligam para formar T3 e duas moléculas de DIT se ligam para formar T4 (DEGROOT E NIEPOMNISZCZE, 1977).

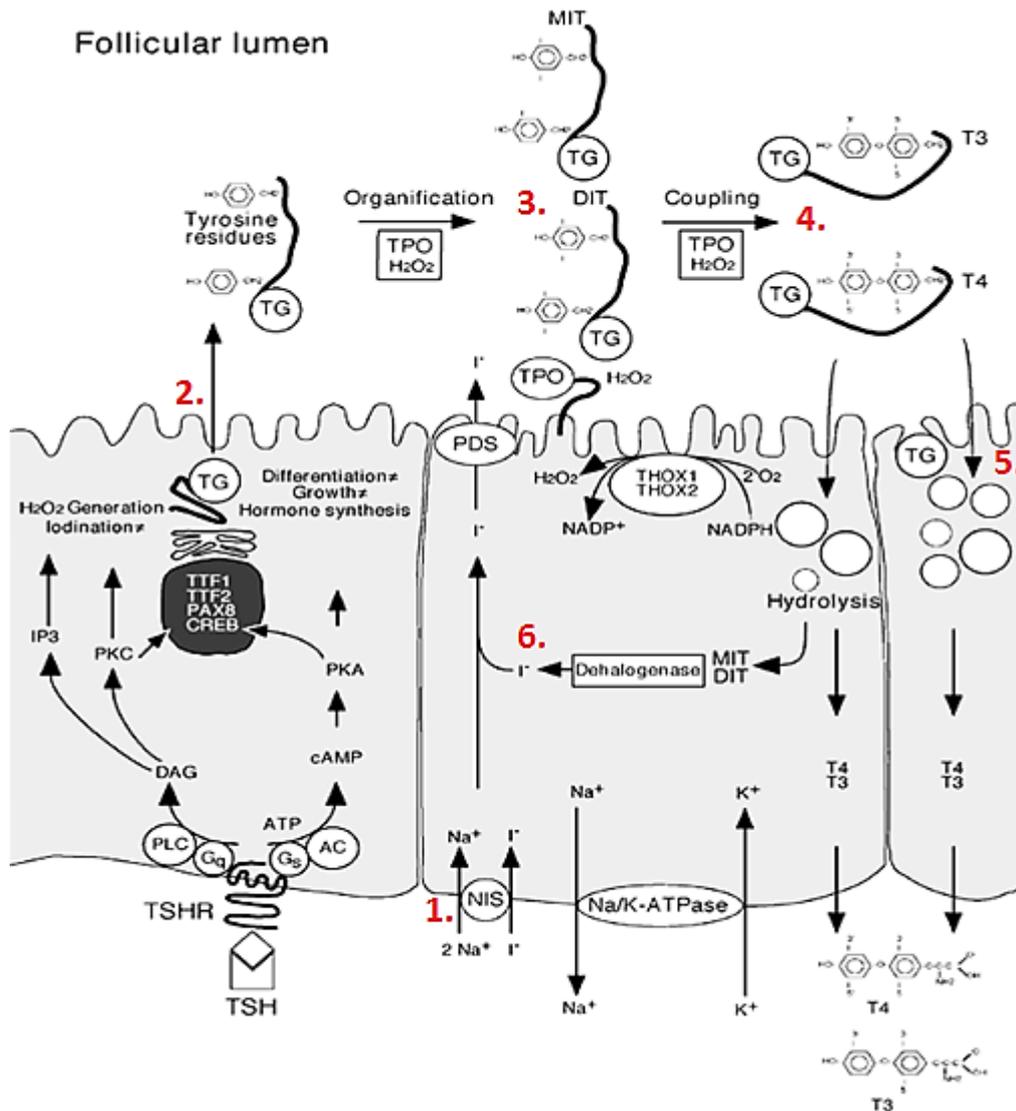


Figura – 1 Esquema representativo da biossíntese dos hormônios tireoidianos e principais vias de sinalização nas células foliculares. 1. O Iodeto é transportado ativamente para as células foliculares da tireóide pelo NIS na membrana basolateral. Na membrana apical, a pendrina medeia o fluxo de Iodeto para o lúmen foliolar; 2. A TG migra para o lúmen foliolar por invaginação; 3. Na presença de H₂O₂, sintetizado pelo sistema DUOX, a enzima TPO promove a oxidação e acoplamento do iodeto na TG formando as iodotirosinas MIT e DIT; 4. Após a junção destas, ainda no lúmen foliolar, ocorre a formação dos hormônios T₃ e T₄; 5. O complexo TG-hormônio invagina na célula com subsequente proteólise para liberação dos hormônios na corrente sanguínea; 6. Reaproveitamento do iodo pela célula (Modificado de VONO-TONIOLO & KOPP, 2004).

A liberação dos HTs (T₃ e T₄) ocorre dentro dos lisossomos após a entrada do complexo TG-hormônio no tireócito, as proteases que intervêm nesse processo são as

catepsinas B e L, e com menor relevância a catepsina D (DUNN, 1991). Os hormônios T3 e T4 difundem-se na circulação sistêmica, enquanto que as moléculas de MIT e DIT que não foram ligadas sofrem a ação da enzima desalogenase 1 (DEHRAL1), responsável pela liberação do iodo para posterior reaproveitamento pela célula (GNIDEHOU *et al.*, 2004).

A regulação dos HTs é feita principalmente pelo TSH (hormônio estimulante da tireóide). Este hormônio produzido pela hipófise anterior, juntamente com seu receptor (TSHR), constituem os principais fatores que estimulam a glândula a produzir e secretar os HTs (DUNN & DUNN, 2001). A síntese de TSH, por sua vez, é estimulada pelo hormônio liberador de tirotrófina (TRH) e inibida pelos hormônios tireoideanos através de um mecanismo de feedback negativo (Figura 2) (VASSART & DUMONT, 1992).

Outro importante regulador da síntese de HTs é a disponibilidade de iodo, em um mecanismo denominado autorregulação da tireóide. Esse processo consiste na alteração da sensibilidade da glândula ao TSH (CAVALIERI, 1997). O excesso de iodo reduz a produção de H₂O₂ impedindo a síntese de HTs (efeito Wolff-Chaikoff) (VAISMAN *et al.*, 2004).

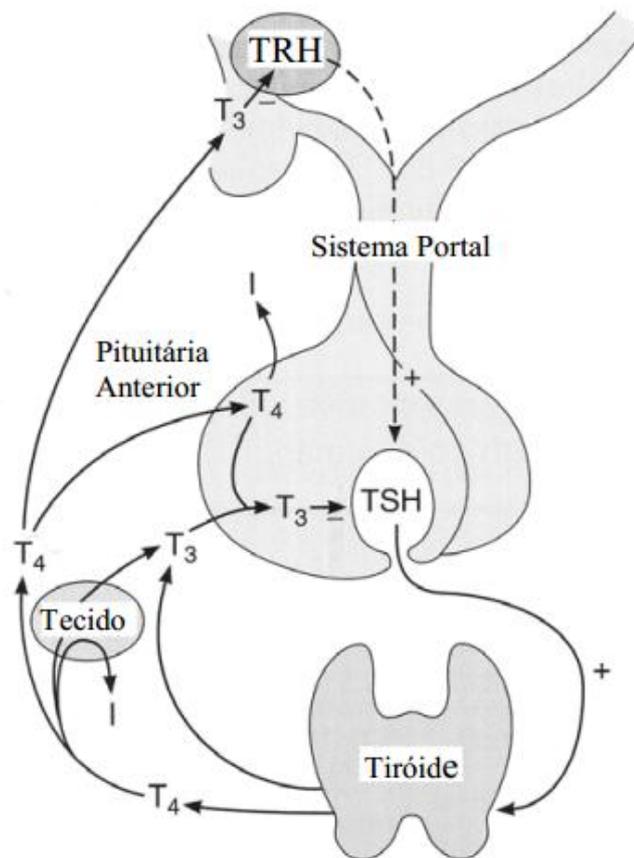


Figura – 2 Regulação da síntese e secreção dos hormônios da tireóide - Eixo hipotalâmico-hipofisário-tiroideu (Fonte: GREENSPAN, 2004. *In* RODRIGUES, 2004).

2.2 A Tireoperoxidase

A enzima tireoperoxidase (OMIM 606765) é uma proteína que apresenta sítios de ligação heme em conjunto com cinco sítios de glicosilação e diversas pontes dissulfeto (TAUROG & DORRIS, 1991). A proteína possui um curto domínio transmembranar que se liga à membrana apical do tireócito com a parte catalítica voltada para dentro do lúmen folicular (PARK & CHATTERJEE, 2005). É sintetizada no retículo endoplasmático rugoso do tireócito e posteriormente transferida para membrana apical onde catalisa a iodação e subsequente acoplamento de resíduos de tirosina na tiroglobulina para formação dos hormônios da tireóide. O gene da TPO humana está localizado no cromossomo 2p25 e consiste em 17 éxons abrangendo 150 Kb, com um RNAm de 3048 nucleotídeos codificando 933 aminoácidos (KIMURA, *et al.*, 1987, ENDO *et al.*, 1995).

O diagnóstico para o defeito na organificação do iodeto é realizado através do teste do perclorato. Este teste consiste na capacidade que o perclorato tem de deslocar o I da captação de iodeto pela TPO. Durante o teste, é administrado radioiodo e perclorato no paciente, posteriormente, verifica-se a eliminação do radioiodo pela urina (AL-JURAYYAN & EL-DESOUKI, 1997). Pacientes que apresentam redução da radioatividade superior a 10% apresentam defeito parcial na organificação do iodeto (PIOD). Em doentes com defeito total (TIOD), a redução da radioatividade é superior a 90%. (DE VIJLDER *et al.*, 2003).

Estudos moleculares sugerem que mutações no gene TPO consistem na causa mais comum de disormonogênese, com diferentes mutações inativadoras identificadas em pacientes com TIOD (BAKKER *et al.*, 2000, FUGAZZOLA *et al.*, 2005). A herança é autossômica recessiva, com a maioria das mutações localizadas no centro catalítico da enzima, o que corresponde aos éxons 7, 8 e 9 do gene (Figura 3) (PANNAIN *et al.*, 1999, RISTALPERS & BIKKER, 2010), embora já tenha sido descrito herança pseudodominante devido à alta prevalência de mutações no gene TPO (DELADOEY *et al.*, 2008).

Mutações no gene TPO são menos frequentes em pacientes com leve insuficiência dos hormônios da tireóide ou PIOD (NASCIMENTO *et al.*, 2003). Esse fenótipo é resultado de mutações heterogêneas, podendo incluir defeitos no gerador de peróxido de hidrogênio (GRASBERGER & REFETTOFF, 2011).

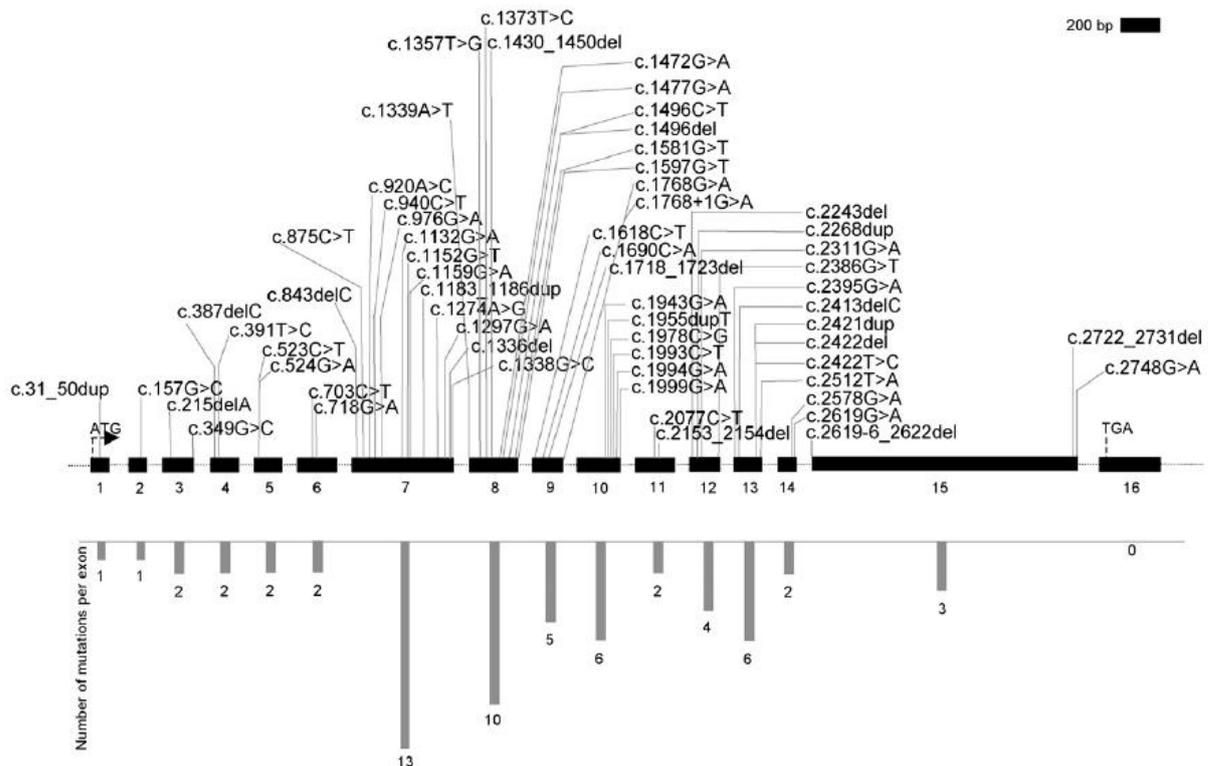


Figura 3 - Esquema do gene TPO com todas as mutações relatadas até o momento. Apenas os éxons estão representados conforme a escala. As mutações estão descritas acima dos éxons, enquanto que o número total de mutações está representado abaixo. Os éxons 7, 8 e 9 codificam o centro catalítico da tireoperoxidase (Fonte: RIS-STALPERS & BIKKER, 2010).

2.3 O Hipotireoidismo Congênito

O Hipotireoidismo Congênito (HC) é o distúrbio endócrino mais frequente ocorrendo em aproximadamente 1/3000-4000 nascimentos (DELANGE, 1997). A prevalência do HC varia entre grupos populacionais, sendo observada em 1:10.000 negros americanos e em 1:2.7000 hispânicos. Também é observada maior prevalência em mulheres (1:4.000 x 1:7.700) (ROBERTS *et al.*, 1997).

A doença é causada pela deficiência ou ausência dos hormônios da tireóide, estes, realizam papel fundamental durante o desenvolvimento, principalmente na vida fetal (OLIVEIRA, 2009). Atualmente, o rastreamento neonatal com tratamento com doses apropriadas estabelecidas antes da terceira semana da vida, previne danos irreversíveis ao desenvolvimento da criança, com desenvolvimento psicomotor normal (BONGERS-SCHOKKING *et al.*, 2000). Segundo Weber *et al.* (2000), a gravidade da doença e o tratamento precoce influenciam na evolução mental, visto que, crianças tratadas 30 dias após o nascimento apresentaram os piores resultados em comparação com as tratadas previamente.

O Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) realiza a detecção do Hipotireoidismo Congênito através da dosagem de TSH sérico em papel filtro. A importância do programa se justifica, uma vez que, quando não diagnosticadas e tratadas precocemente, o HC chega a constituir a causa mais comum de retardo mental prevenível (LAFRANCHI, 1995). O tratamento consiste na reposição hormonal com L-tiroxina e é mantido por toda a vida em casos de HC permanente (SELVA *et al.* 2005).

Os sintomas são pouco específicos nos primeiros dias após o nascimento devido à transferência de T_4 da mãe para o feto. A severidade da doença depende do tempo de permanência em um estado de hipofunção tireóidea caracterizando um quadro clínico grave (Figura 4) com os seguintes sintomas: hérnia umbilical, macroglossia, distensão abdominal, braquicardia, septo nasal incompleto, face mixedematosa com pele seca e fria, atraso na maturação óssea, maior abertura na fontanela posterior, glândula tireóide ectópica ou hipoplásica, choro rouco, icterícia prolongada, dificuldade para alimentar-se, hipotonia, bócio (oferecendo indícios de disormonogênese) e posterior alteração no desenvolvimento neurológico em pacientes não tratados (GRANT *et al.*, 1992).



Figura 4– Criança com hipotireoidismo congênito. A – bebê de 3 meses com HC não tratado. A imagem demonstra postura hipotônica, face mixedematosa, macroglossia e hérnia umbilical; B – close-up do rosto, apresentando face mixedematosa, macroglossia e manchas na pele; C – close-up mostrando distensão abdominal e hérnia umbilical (Fonte: RASTOGI & LAFRANCHI, 2010).

2.3.1 Classificação e etiologia do HC

O hipotireoidismo está classificado em primário, secundário ou terciário (os dois últimos também chamados de hipotireoidismo central) (Tabela 2). O primeiro ocorre quando a lesão se encontra na glândula tireóideia e os últimos correspondem ao defeito na hipófise ou hipotálamo respectivamente. O Hipotireoidismo primário (HP) pode ser permanente – decorrente de defeitos na embriogênese da glândula, sendo denominado disgenesia tireoidiana (DT) (KLETT, 1997) ou decorrente de defeito na biossíntese dos HT's (disormonogênese) (BAKKER *et al.*, 2000); ou transitório – através da ingestão materna de drogas antitireoidianas (LOMENICK, JACKSON & BACKELJAUW, 2004); passagem transplacentária de anticorpos bloqueadores do receptor de TSH (PACAUD *et al.*, 1995) ou ainda deficiência ou excesso de iodo (GAUDINO *et al.*, 2005).

A disgenesia tireoidiana ocorre em 85% dos casos de HP permanente e inclui a hemiagenesia e agenesia da glândula (20-42%), a glândula ectópica (35-42%) e hipoplasia tireoidiana (24-36%) (KLETT, 1997). A DT ocorre, na maioria dos casos, de forma esporádica, com apenas 2% de casos familiares (CASTANET *et al.*, 2001). Possíveis mutações nos fatores de transcrição TTF2, TTF1 e PAX-8 são os responsáveis por esse tipo de HC. A glândula hipoplásica tem sido associada com mutações no gene do PAX-8 e/ou no gene do receptor de TSH (CONGDON *et al.*, 2001).

Os defeitos da síntese hormonal são chamados de disormonogênese e ocorrem em 10- 15% dos casos de HC, clinicamente esses pacientes podem apresentar bócio. Os 5% restantes ocorrem na transferência de anticorpos maternos para a criança (CASTANET *et al.*, 2001). Durante a disormonogênese podem ocorrer defeitos em várias etapas da biossíntese dos hormônios tireoidianos como: defeito no transportador de iodeto na membrana basal (NIS - *sodium-iodidesymporter*), gene SLC5A5 (DE LA VIEJA *et al.*, 2000); defeito no transportador de iodeto na membrana apical (PDS ou pendrina) caracterizando a Síndrome de Pendred, gene SLC26A4 (SHEFFIELD *et al.*, 1996); defeito na síntese de Tireoglobulina (TG), considerada como um pró-hormônio, locus 8q24 (MENDIVE *et al.*, 2001) e finalmente defeitos na organificação do iodeto, envolvendo duas NADPH oxidases (THOX1 e THOX2 – também conhecidas como LNOX ou DUOX) (DE DEKEN *et al.*, 2000) e a enzima Tireoperoxidase (TPO) correspondendo à maioria dos casos de disormonogênese (BAKKER *et al.*, 2000) com incidência de 1:40.000 (KNOBEL & MEDEIROS-NETO, 2003).

Tabela - 2 Etiologia do hipotireoidismo congênito.

Hipotireoidismo congênito permanente
Primário
Disgenesia tireóidea
Agenesia
Ectopia
Hipoplasia
iatrogênico (terapia materna com radioiodo)
Distúrbios hereditários da síntese hormonal tireóidea
Secundário e terciário
Resistência periférica ao hormônio tireóideo
Hipotireoidismo Congênito transitório
Deficiência de iodo
Excesso de iodo
Uso materno de drogas antitireóideas
Anticorpos maternos bloqueadores de TSH
Idiopático

Fonte: KNOBEL, NOGUEIRA & MEDEIROS-NETO, 2001.

O hipotireoidismo central ocorre na falta de estímulo do TSH na tireóide devido à malformação ou disfunção hipofisária ou hipotalâmica (LAFRANCHI, 1998) estando associado com os fatores de transcrição POU1F1, PROP1, LHX3, HESX1 e mutações no TSH beta ocasionando deficiência na produção e secreção de hormônios na hipófise anterior como o TSH (RADOVICK *et al.*, 1992; WU *et al.*, 1998; NETCHINE *et al.*, 2000; THOMAS *et al.*, 2001). A Síndrome de resistência ao hormônio tireoidiano (SRHT) é um distúrbio raro ocasionando hipotireoidismo devido à resposta diminuída às concentrações de T₃ (REFETOFF, WEISS & USALA, 1993).

Diferentes mutações promovem a complexa etiologia da doença, com isso a incidência para as diferentes etiologias do HC variam bastante entre os grupos étnicos. Para responder questões como essas, recorre-se aos estudos populacionais.

2.4 Genética de populações

Os estudos genéticos de populações humanas são utilizados visando a compreensão da história, demografia e evolução da espécie humana, além de estudos de ancestralidade e de mapeamento de genes de relevância clínica. O que se tem observado nesse tipo de estudo, é uma aplicabilidade cada vez maior na área médica e no estudo de doenças genéticas em geral.

Dentre as análises mais usadas em estudos populacionais para medir a variabilidade genética estão a taxa de heteroziguidade e o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). Este último cálculo estipula que, após uma geração de cruzamento, as frequências genótípicas para um loco com dois alelos, A e a, devem seguir o descrito: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Onde “ p^2 ” é a frequência esperada do genótipo AA; “ $2pq$ ” é a frequência esperada do genótipo Aa e “ q^2 ” é a frequência esperada para o genótipo aa (BEIGUELMAN, 1995).

Se, ao compararmos as frequências genótípicas de uma população real com uma em equilíbrio de Hardy-Weinberg, obtivermos significativo desvio das frequências, podemos sugerir que algo interessante (tal como seleção ou ausência de cruzamentos aleatórios) possa estar acontecendo na população. O HWE pode não se manter em populações reais, mas apresenta boas aproximações se o tamanho populacional for grande, se os casamentos forem ao acaso, e se não houver uma sobrevivência diferencial de zigotos com um genótipo específico para um determinado locus (BEIGUELMAN, 1995).

Os estudos populacionais constituem um poderoso instrumento de investigação para caracterizar a composição genética de diferentes populações, uma vez que a frequência dos alelos de marcadores e o padrão de haplótipos (combinação de diferentes locos alélicos) são característicos de cada etnia e população. Assim, variações étnicas na prevalência do Hipotireoidismo congênito podem refletir diferenças na susceptibilidade genética causada por mutações. Diferentes incidências de HC também podem estar relacionadas à exposição ambiental (insuficiência de iodo), no entanto, as causas ambientais que operam no útero causando HP permanente são menos prováveis, pois não foram verificadas tendências temporais ou sazonais para DT (DELADOEY, 2007).

Nesse contexto, a susceptibilidade genética desempenha um papel importante na prevalência de HC em diferentes etnias. Porém são escassos os estudos que consideram a etiologia ou diferentes grupos étnicos (Tabela 3). O que se observa é uma menor prevalência de disgenesia em negros, que possuem uma maior diversidade genética (Schuster, 2010). Em contraste, caucasianos são mais propensos a desenvolver disgenesia (STOPPA-VAUCHER, VLIET & DELADOEY, 2011). Segundo Lohmueller (2008) existe também maior número de mutações deletérias em caucasianos do que em negros.

Tabela - 3 Estudos na literatura sobre a incidência de Hipotireoidismo Congênito em diferentes etnias.

Referências	Ano	Área estudada	Etnia	Incidência ^a /porcentagem ^b
Brown <i>et al.</i> (10)	1979-1981	Geórgia	Branco	1:5526
			Negro	1:32,377
			Oriental	1:2128
Grant & Smith (27)	1982-1984	Inglaterra, Gales, Irlanda do Norte	Negro	0,6% ^b
			Asiático	12% ^b
Rosenthal <i>et al.</i> (13)	1981-1987	Noroeste da Inglaterra	Asiático	1:918
			Não-asiático	1:3391
Lorey & Cunningham (11)	1982-1989	Califórnia	Asiático	1:4464
			Negro	1:10,989
			Hispânico	1:1785
			Nativo americano	1:2493
			Branco	1:4166
			Outro	1:3906
Roberts <i>et al.</i> (28)	1979-1992	Atlanta	Branco não-hispânico	1:4400
			Negro	1:10,000
Kaiserman <i>et al.</i> (9)	1979-1987	Israel	Asiático	1:4425 ^c
			Africano	1:4464 ^c
			Americano/ Europeu	1:3367 ^c
			Israelita	1:7476 ^c
Waller <i>et al.</i> (12)	1990-1998	Califórnia	Branco	1:3533
			Hispânico	1:2217
			Negro	1:11,494
			Negro/Hispânico	1:4149
			Asiático ^a	1:2506

^a: Incidência de HC (todas as etiologias incluídas); ^b: Porcentagem de grupos étnicos, porém não há informação sobre a composição da população; ^c: Foram usadas etnia materna para o estudo; Os asiáticos incluem filipinos, chineses, vietnamitas, japoneses, coreanos e indianos (Modificado de STOPPA-VAUCHER, VLIET & DELADOËY, 2011).

2.4.1 Marcadores moleculares

Em indivíduos diferentes, o perfil de DNA contém muitos polimorfismos, representados pelas posições onde a sequência de nucleotídeos difere em cada membro da população, esses polimorfismos podem ser utilizados como marcadores moleculares. Para ser considerado um polimorfismo, o alelo raro de um determinado loco deve estar presente em mais de 1% dos indivíduos da população (YANG, 2005). Assim, esta grande variação no número e no tipo de variações constitui ferramenta valiosa e praticamente inesgotável para os estudos populacionais, investigações de parentesco, testes de paternidade e estudos forenses. A tabela 4 apresenta alguns dos marcadores mais utilizados em genética de populações e suas principais características.

A primeira técnica utilizada para a identificação de marcadores foi o RFLP (do inglês Restriction Fragment Length Polymorphism) (BOTSTEIN *et al.*, 1980), bastante utilizada durante muitos anos. Contudo, com o desenvolvimento da técnica de Reação em Cadeia da

Polimerase (PCR), concebida por Kary Mullis na década de 80, ocorreu uma revolução no estudo das variações genéticas. Esta técnica permite a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um determinado fragmento de DNA (MULLIS & FALOONA, 1987), tornando possível o estabelecimento de novas gerações de marcadores baseados em PCR.

As primeiras sequências utilizadas como marcadores genéticos foram os minissatélites ou VNTRs (do inglês Variable Number of Tandem Repeats) e microsatélites ou STRs (do inglês Short Tandem Repeats). Ambos apresentam um alto grau de polimorfismo de comprimento, variando no número de unidades de repetição. Devido ao menor motivo de unidades de repetição em microsatélites (1-6 pb), estes apresentam maior polimorfismo e alta distribuição no genoma em relação aos minissatélites (15-35 pb) (KIMPTON *et al.*, 1993).

O avanço da tecnologia na análise do genoma humano permitiu o surgimento de um novo grupo de marcadores polimórficos caracterizados pela variação em um único nucleotídeo, os SNPs (do inglês Single Nucleotide Polymorphism) (TWYMAN & PRIMROSE, 2003). Estes marcadores constituem os sítios mais polimórficos do genoma humano com frequência aproximada de 1 em cada 1000 pares de bases (pb). Os SNPs são importantes para estudos evolutivos e diagnóstico de doenças, porém não são informativos para identificação individual (AMORIM & PEREIRA, 2005).

Tabela - 4 Caracterização dos marcadores moleculares mais utilizados em genética de populações com suas principais características.

VARIÁVEL	ISOENZIMAS	RFLP	RAPD	STRs	AFLP	SNPs
Modo de observação do polimorfismo	Genes expressos: formas alternativas de enzimas	Fragmento de restrição de DNA detectado por hibridização com sonda de DNA genômico ou cDNA	Segmentos de DNA amplificados arbitrariamente	Amplificação específica da região contendo sequência repetitiva	Segmento amplificado via PCR após digestão de DNA com enzima	Sequenciamento; gel de poliacrilamida após digestão com enzimas de restrição.
Expressão Gênica	Co-dominante	Co-dominante	Dominante	Co-dominante	Dominante	Co-dominante
Numero de alelos/loco	Média de 2 a 4 alelos por loco	Multialélico	2 alelos	Altamente multialélico	2 alelos	1 alelo
Disponibilidade no genoma	20 a 50 em geral	Praticamente ilimitada	Praticamente ilimitada	Praticamente ilimitada	Praticamente ilimitada	Praticamente ilimitada
Distribuição no genoma	Regiões de cópia única	Regiões de baixo número de cópias	Uniforme	Uniforme	Uniforme	Uniforme

2.4.2 Microssatélites

Os microssatélites (STRs) são marcadores moleculares constituídos de repetições curtas em tandem de 1 a 6 pares de bases (SUBRAMANIAN, MISHRA & SINGH, 2003). O número de repetições do motivo varia muito entre indivíduos originando os polimorfismos de comprimento, em que cada polimorfismo constitui um alelo. Os STRs de maior valor para a identificação humana são aqueles que apresentam alto poder de discriminação (> 90%), maior frequência de heterozigotos (>70%), baixa taxa de mutação, menor tamanho e baixa formação de *stutters*, fragmentos de DNA não repetitivo (com o mesmo tamanho da unidade repetitiva) inseridos dentro do marcador, podendo ser facilmente confundido com outro alelo (de unidade repetitiva maior) durante a visualização no gel (JOBIM; JOBIM; BRENNER, 1999 *apud* MARTINS, 2008).

Segundo Ellegren (2004), os microssatélites podem ser classificados de acordo com o número de pares de bases por motivo de repetição em mono, di, tri, tetra, penta ou hexanucleotídeos; e de acordo com sua estrutura, em: a) perfeito: a sequência das bases se repete sem interrupções; b) imperfeito: há presença de nucleotídeo diferente da estrutura repetitiva; c) interrompido: a sequência repetitiva é intercalada por nucleotídeos não repetitivos; d) compostos: são constituídos por mais de uma sequência repetitiva diferente. (BHARGAVA & FUENTES, 2010).

Os marcadores STRs estão espalhados pelo genoma (Figura 5) em regiões não codificadoras e também entre os genes. Eles correspondem a aproximadamente 3% do genoma humano, dos quais, tri- e hexanucleotídeos são mais abundantes em éxons, enquanto que os demais são mais abundantes em regiões não codificantes (intergênicas e intrônicas) (SUBRAMANIAN, MISHRA & SINGH, 2003). A grande maioria dos locos de microssatélites estão presentes em regiões não codificantes, sendo relativamente neutros (WREN *et al.*, 2000). Porém, uma quantidade significativa de STRs está presente em regiões codificantes ou regulatórias, sendo funcionalmente importantes na organização e função genômica, podendo assim estar associados às condições de algumas doenças, porém, sua análise sistemática foi pouco relatada (LI *et al.*, 2004). Uma importante característica dos tetranucleotídeos é a menor taxa de mutação e maior estabilidade genética.

Os STRs apresentam os requisitos básicos para a utilização em Genética de populações como: padrão de herança mendeliana, independência entre locus, codominância, altamente polimórficos, suficiente taxa de mutação e genotipagem em curto período de tempo (THOMSON *et al.*, 1999). Microssatélites podem ainda ser utilizados em estudos de

associação para locus de susceptibilidade, nos quais se verifica que tal alelo aumenta o risco, mas sozinho, não é necessário nem suficiente para ocasionar a expressão da doença, visto que é necessário a adição de outros fatores, genéticos ou ambientais, para manifestação da doença (GREENBERG, 1993).

Estudos de locus de susceptibilidade verificam inicialmente se os pacientes possuem um determinado alelo num locus marcador mais frequente do que a população em geral. Várias explicações têm sido propostas para o fenômeno de associação, por exemplo, a existência de múltiplos genes que interagem (epistasia) ou um locus da doença em desequilíbrio de ligação com o locus marcador (GREENBERG, 1993). Um dos tipos mais comuns de estudo de associação é visto em condições tais como na doença autoimune da tireóide, chamada doença de Graves, associado com antígenos do sistema HLA (HLA-DRw3), em que 50% dos pacientes têm um alelo que é encontrado em 20% da população (FARID *et al.*, 1979; ALLANIC *et al.*, 1980) agindo como um locus de susceptibilidade.

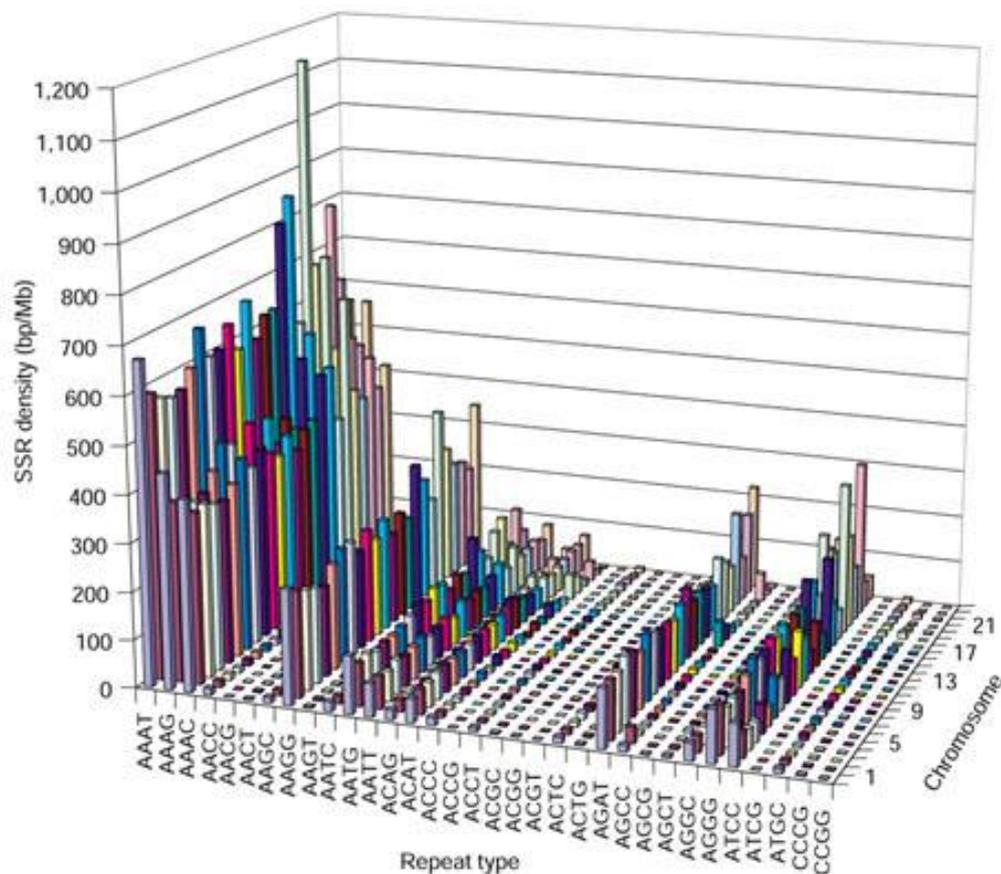


Figura 5 - Densidade de cada tetranucleotídeo por cromossomo no genoma humano. (Fonte: SUBRAMANIAN, MISHRA & SINGH, 2003).

O entendimento dos processos evolucionários responsáveis pela variação genética total é essencial para o entendimento das variações responsáveis pela patogênese de doenças complexas (JORDE *et al.*, 2001). A dinâmica de mutação dessas regiões ainda não é bem compreendida. As taxas de mutações em STRs são altas, com uma média de 6×10^{-4} (GOLDSTEIN *et al.*, 1995) e geralmente seguem o modelo de mutação “*step-wise mutation model - SMM*” (Figura 6) desenvolvido por OHTA e KIMURA (1973). Este modelo, também conhecido como deslizamento de replicação, sugere que a mutação pode acontecer somando ou diminuindo uma sequência repetitiva à sequência herdada do indivíduo. A adoção do modelo SMM implica que diferenças em tamanho entre dois alelos são informativas: quanto maior a diferença, maior o número de eventos mutacionais que ocorrem desde a ancestralidade comum destes dois alelos e menor a relação biológica entre eles (ELLEGREN, 2004).

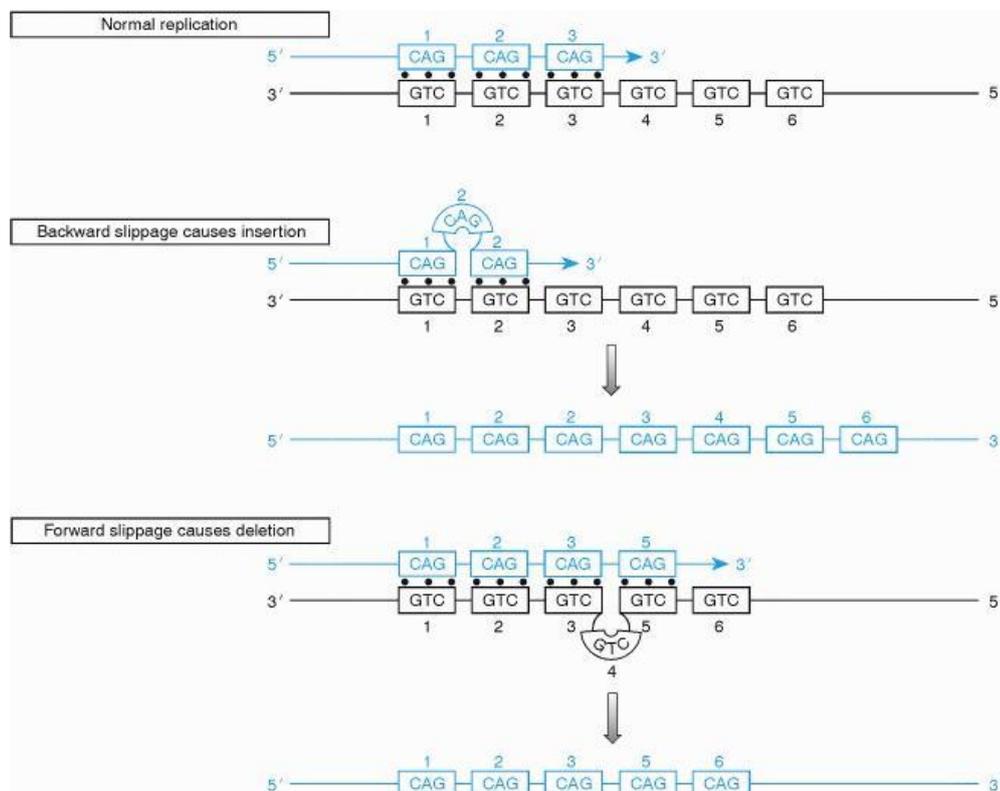


Figura 6- Mecanismo de formação de STR através do escorregamento da DNA polimerase durante a replicação podendo causar inserções ou deleções (Fonte: STRACHAN & READ, 1999).

Outro mecanismo relacionado ao surgimento dos STRs estaria relacionado ao *crossing-over* desigual durante a recombinação. Contudo, evidências sugerem que é a

replicação, e não a recombinação, o principal mecanismo responsável pela evolução dos STRs. Tais evidências são baseadas no fato de que, cepas de leveduras deficientes em genes de recombinação não apresentaram taxas de mutação alteradas (HENDERSON & PETES, 1992) e de que as taxas de mutação no cromossomo Y (não-recombinantes) são similares às de sequências recombinantes (KAYSER *et al.* 2000).

Alguns STRs estão associados a vários tipos de câncer, através de um processo de instabilidade mutacional ocasionado pela deficiência no sistema de reparo por pareamento incorreto (JACOB & PRAZ, 2002). Podem estar localizados também próximo do gene ou em regiões intrônicas, sofrendo assim os efeitos da pressão seletiva que ocorre dentro dos genes (LEITE, 2006), como o STR HumTPO.

2.4.3 O STR HumTPO

O microsatélite HumTPO (Figura 7), analisado no presente estudo, foi caracterizado por ANKER *et al.* (1992). Este tetranucleotídeo está localizado no íntron 10 do gene TPO e tem sido descrito como altamente polimórfico com um alto grau de variabilidade genética (ANKER, STEINBRUECK & DONIS-KELLER, 1992; TAKESHITA, MEYER & BRINKMANN, 1997). Este STR faz parte dos principais marcadores STR utilizados pelo sistema CODIS (Combined DNA Index System) na identificação criminal de indivíduos, padronizados pelo FBI (do inglês Federal Bureau of Investigation) (BUDOWLE & MORETTI, 1999).

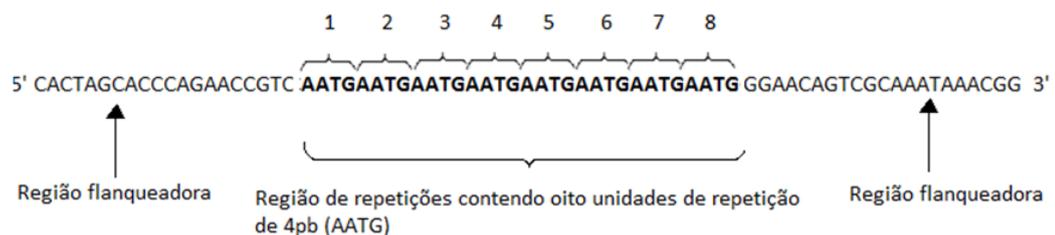


Figura 7 – Ilustração mostrando a estrutura do *Short Tandem Repeat* (STR) HumTPO. O número de unidades de repetições AATG varia entre os indivíduos. Cada número acima da região repetitiva representa uma repetição do STR.

PIRRO *et al.* (1995) fizeram um estudo de associação entre o STR HumTPO e o HC em pacientes com doenças autoimunes da tireóide em uma população caucasiana do sul da Itália. Dentre as doenças da tireóide foram investigadas a Doença de Graves, a Tireoidite

autoimune e pacientes com bócio nodular sem doença autoimune. O estudo não encontrou associação entre as doenças autoimunes da tireóide e o microssatélite.

GOMES *et al.* (2007) investigaram a frequência alélica de 13 microssatélites em 323 indivíduos não aparentados da Paraíba. Dentre eles, o HumTPO, para fins de investigação forense, encontrando de 4 a 12 repetições deste microssatélite na população.

O presente trabalho tem o intuito de analisar as frequências alélicas do microssatélite HumTPO em pacientes com Hipotireoidismo Congênito que apresentam disormonogênese, acompanhados pelo serviço de endocrinologia do Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC) e controles (indivíduos sem HC) na cidade de Campina Grande – Paraíba, para fins de caracterização dos alelos desse marcador na população, permitindo a verificação da variabilidade genética presente nas amostras estudadas e a interação entre o marcador e o Hipotireoidismo Congênito.

2.5 Objetivos

2.5.1 Geral

- Analisar a interação entre o STR HumTPO e o HC por disormonogênese através da verificação de possíveis alelos presentes apenas em pacientes com HC;

2.5.2 Específicos

- Analisar as frequências alélicas e genotípicas dos grupos estudados;
- Observar a segregação do marcador HumTPO nos casos familiares de HC;
- Inferir sobre a variabilidade genética presente na população estudada.

3. METODOLOGIA

3.1 Local de estudo e amostragem

A Pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual da Paraíba - Campus I, em Campina Grande, Paraíba.

No presente estudo foram incluídos dois grupos. O primeiro grupo inclui 25 pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial confirmado para Hipotireoidismo Congênito e acompanhados pelo serviço de endocrinologia do Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC/UFCG). Todos os pacientes apresentaram glândula com tamanho e localização normais e alguns apresentando bócio, sugerindo disormonogênese. Dentre a nossa amostra existem casos familiares de HC em três famílias diferentes, uma delas apresentando consanguinidade (Figuras 11 - 13). A média de idade dos pacientes foi de 21,3 anos, possuindo faixa etária de 5 meses a 55 anos, com 52% dos indivíduos do sexo masculino.

O segundo grupo foi composto por 22 pessoas sem HC, não aparentadas e com distribuição de sexo e idade pareado com os pacientes. Todos os indivíduos incluídos neste estudo assinaram um termo de consentimento autorizando a utilização das amostras na pesquisa e o projeto foi aprovado pelo comitê de ética do HUAC.

A população estudada é originária da 2ª macrorregião de saúde da Paraíba (Figura 8), a maioria oriunda do município de Campina Grande, local onde são acompanhados os pacientes. Alguns indivíduos são também oriundos de cidades próximas como Queimadas, Ingá, Boa Vista e Taperoá. Este é o primeiro estudo na Paraíba que compara a distribuição alélica entre indivíduos saudáveis e pacientes com HC.

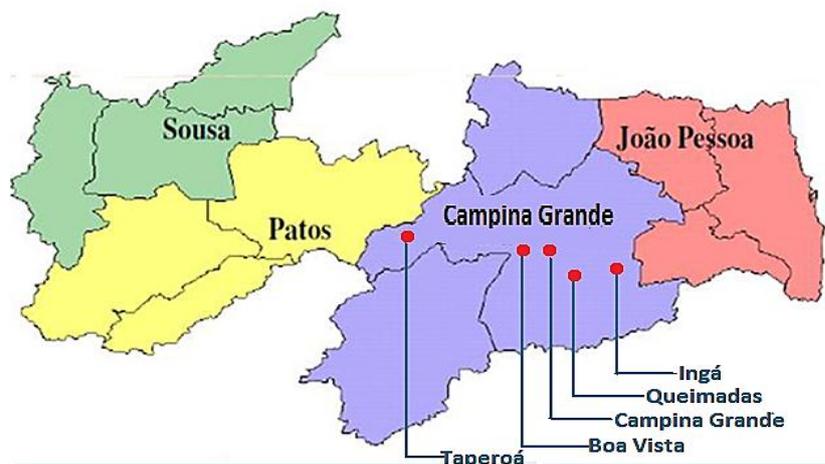


Figura 8 – Mapa do estado da Paraíba mostrando as quatro macrorregiões de Saúde. A amostra pertence à 2ª macrorregião de saúde, destacado em roxo no mapa. (Modificado de SOUSA, 2011).

3.2 Coleta e extração de DNA genômico

O material coletado foi obtido através de punção venosa com volume de 10 ml, armazenado em tudo de coleta à vácuo com EDTA (Ácido etilenodiaminotetracetato) em temperatura de 4°C.

A extração do DNA genômico foi realizada com o Kit comercial Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin (Ge Healthcare Kit 28-9042-64), seguindo as recomendações do fabricante. Também foi realizada extração orgânica utilizando o protocolo de Sambrook e Russell (2001).

3.3 Amplificação e genotipagem das amostras

O microssatélite HumTPO foi amplificado pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando os oligonucleotídeos descritos por ANKER *et al.* (1992). iniciador direto: 5'CACTAGCACCCAGAACCGGTC3'; iniciador reverso: 5'CCTTGTCAGCGTTTATTTGCC 3' (Eurofins).

A PCR foi realizada com volume final de 20 μ l contendo 20-40ng de DNA genômico; 1 μ M de cada iniciador; 200 μ M de cada dNTP; 1,5 mM MgCl₂; 100mM Tris-HCL, pH8, 4,100mM (NH₄)₂SO₄, 100mM KCL, 1% Triton X-100 e 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Phoneutria). As amplificações foram realizadas em um termociclador Therm-1000 Maxygene, programado para 10 min a 94° C, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94° C, 30 s a 63° C e 30 s a 72° C, com extensão final de 72° C por 5 min.

Os produtos da PCR foram separados em eletroforese em cuba vertical com gel desnaturante de poliacrilamida a 6% com adição de uréia 7M, com tampão TBE 0,5X (Tris, Ácido Bórico e EDTA) e Persulfato de Amônio (10%), TEMED (1%). A amostra para aplicação no gel foi preparada com 4 μ l do produto da PCR, 5 μ l de formamida e 2 μ l de tampão de amostra (Tris 10mM, pH 7.5; EDTA 10mM e Azul de Bromofenol). Antes da aplicação, as amostras foram submetidas à desnaturação por 5 minutos e imediatamente acondicionadas em gelo.

A corrida eletroforética teve duração de 1,5 horas, com voltagem de 120 Volts, 11 miliAmperes e pré-corrida de 50 Volts durante 15 minutos. Os géis foram corados com nitrato de prata e revelados com Hidróxido de Sódio (CRESTES *et al.*, 2001). O tamanho dos fragmentos amplificados foi caracterizado por um marcador padrão de peso molecular de 50

pb (Invitrogen) com aplicação de 10 μ l em cada gel e por uma amostra conhecida para o marcador HumTPO (controle n°23). A nomenclatura dos alelos foi baseada no número de repetições de cada amostra.

3.4 Análise dos resultados

As frequências alélicas foram calculadas por contagem direta dos alelos. Para análise dos resultados foi utilizado o programa Arlequin versão 3.5 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010), em que foi realizado o cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, heterozigosidade esperada e observada e o valor de p. O teste do chi-quadrado (χ^2) foi utilizado para verificar a significância dos valores observados e esperados (utilizou-se $p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Frequências alélicas do STR HumTPO

O marcador polimórfico estudado é um tetranucleotídeo com repetição AATG contido no íntron 10 do gene da TPO humana descrito por Anker *et al.* (1992). As frequências alélicas foram analisadas em uma população oriunda da 2ª macrorregião de saúde da Paraíba, com a maioria dos indivíduos naturais do município de Campina Grande. A amostra foi dividida em dois grupos, o primeiro composto de pacientes com HC sugerindo disormonogênese e o segundo grupo composto por indivíduos saudáveis e não aparentados.

Na análise foram encontrados um total de 7 alelos: 6, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 (o nome dos alelos corresponde ao número de repetições) (Figura 9). O alelo 7 não foi encontrado em nenhum indivíduo. Os fragmentos visualizados no gel variaram entre 106-134pb.

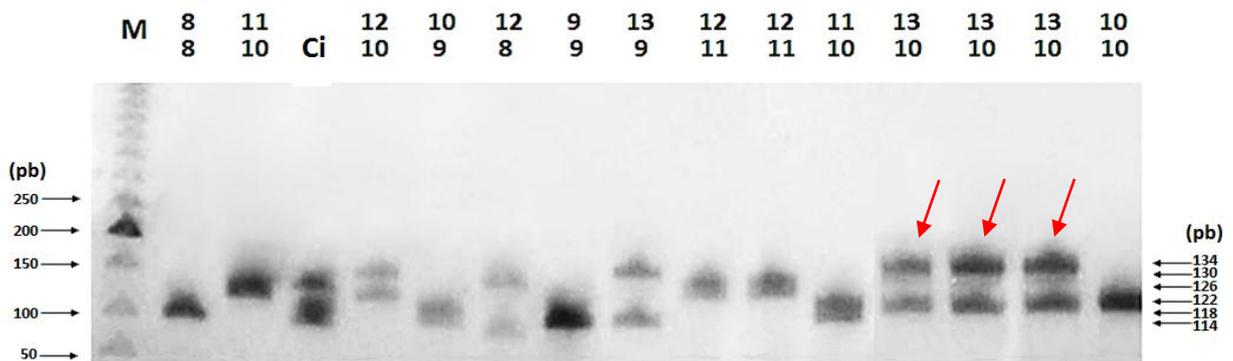


Figura – 9 Perfil eletroforético de alelos do STR HumTPO. A eletroforese foi realizada em gel desnaturalante de poliacrilamida (6%) com uréia (7M). Acima do gel estão representados os alelos de cada indivíduo. As setas ao lado indicam a posição de cada alelo com seu tamanho em pares de base. No gel estão representados fragmentos amplificados de controles com tamanho variando entre 114 e 134 pb, com destaque para o alelo 13, considerado raro para a população brasileira. M: Marcador de peso molecular; Ci: Controle interno (alelos 8, 9 e 11); pb: pares de base.

A frequência total dos alelos 6, 8, 9, 10, 11, 12 e 13, foram 0,01, 0,35, 0,07, 0,23, 0,26, 0,03 e 0,04, respectivamente (Gráfico 1). Dentre os alelos observados, 5 foram encontrados em pacientes (alelos 6, 8, 9, 10 e 11) e 6 foram encontrados em controles (alelos 8, 9, 10, 11, 12 e 13). As diferenças entre os dois grupos estudados estão restritas à presença dos alelos 12 e 13 somente em controles (em 3 e 4 indivíduos respectivamente) e no alelo 6 foi encontrado apenas em um paciente (Figura 10).

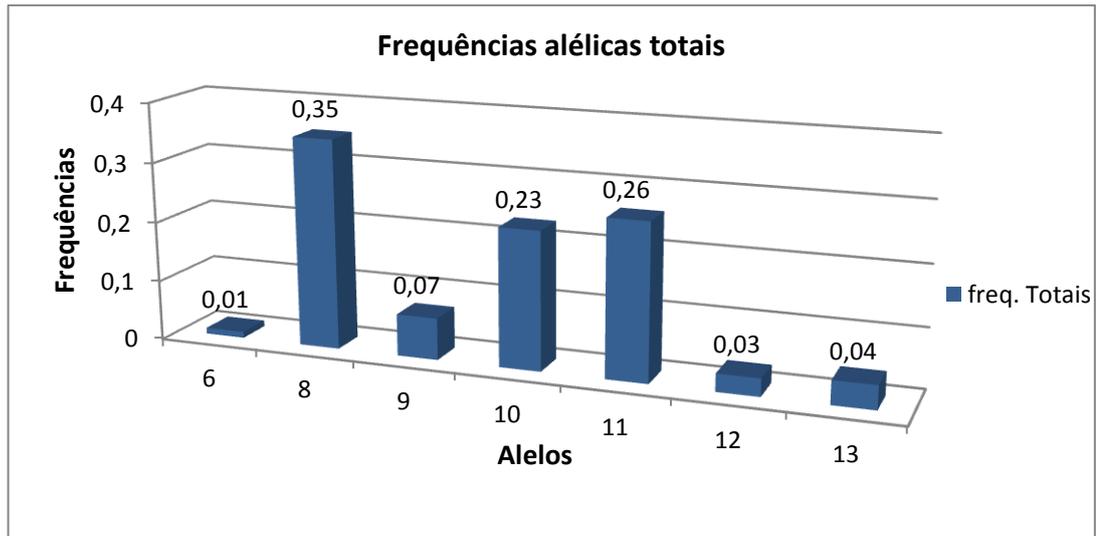


Gráfico – 1 Frequências alélicas totais.

A distribuição das frequências alélicas do STR HumTPO em pacientes e controles está representada no gráfico 2. Não há diferença significativa entre os grupos estudados ($X^2_{(1)} = 0,010$) ($0,95 > p > 0,9$). O único alelo encontrado exclusivamente em pacientes (alelo 6) tem uma baixa frequência na população em geral.

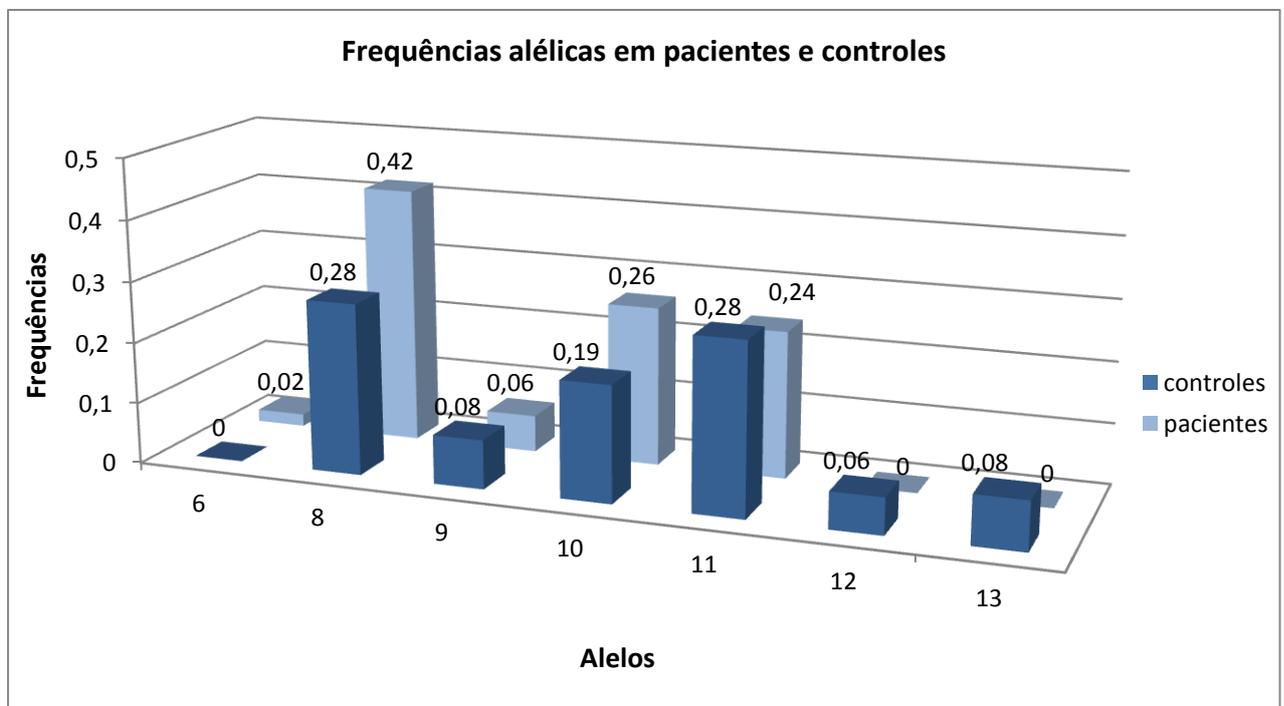


Gráfico – 2 Frequências alélicas encontradas em pacientes e controles.

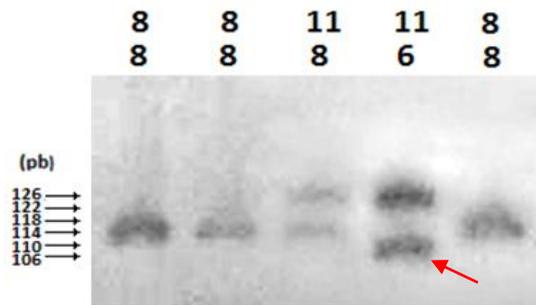


Figura – 10 Gel de poli-acrilamida (6%) contendo uréia (7M) mostrando a presença do alelo 6, encontrado em apenas um paciente.

4.2 Frequências genótípicas do STR HumTPO

A composição genotípica dos dois grupos também foi estudada. Foram observados um total de 14 genótipos para o marcador HumTPO e heterozigosidade total de 0,6875. Dentre o número total de genótipos, 7 foram encontrados em pacientes e 11 em controles. A distribuição genotípica de cada grupo está representada na tabela 5.

Tabela – 5 Tabela de frequências genótípicas.

Genótipo	Grupo de pacientes (N= 25)		Grupo de controles (N= 23)		Frequência total (N= 48)
	Pacientes	frequência	Controles	frequência	
8/8	P2, P3, P6, P15;	0,16	C11, C13, C21, C23;	0,17	0,16
8/10	P7, P8, P10, P13, P14, P17;	0,24	-	-	0,12
8/11	P1, P4, P18, P19, P20, P21, P25;	0,28	C15, C16, C19, C22;	0,17	0,23
9/10	P9, P11, P16;	0,12	-	-	0,06
10/10	P12, P23;	0,08	C10;	0,04	0,06
11/11	P22, P24;	0,08	C18;	0,04	0,06
6/11	P5;	0,04	-	-	0,02
8/12	-	-	C1;	0,04	0,02
9/9	-	-	C2;	0,04	0,02
9/11	-	-	C17;	0,04	0,02
9/13	-	-	C3;	0,04	0,02
10/11	-	-	C6, C12, C14, C20;	0,17	0,08
10/13	-	-	C7, C8, C9;	0,13	0,06
11/12	-	-	C4, C5;	0,09	0,04

Na tabela está representada a frequência de cada genótipo com seus representantes nos diferentes grupos. N= número de indivíduos. P: paciente; C: controle.

A taxa de heterozigosidade observada (H_o) em pacientes foi de 0,68 ($p= 0,02875$). Os controles apresentaram $H_o= 0,695$ ($p= 0,01437$) (tabela 6). Realizou-se o teste do chi-

quadrado a fim de verificar se a amostra total (considerando os dois grupos) está em equilíbrio de Hardy-Weinberg. De acordo com esse teste, não há diferença significativa entre a H_o e H_e do total de amostras ($X^2_{(1)} = 0,006$) ($0,95 > p > 0,9$). Demonstrando que a amostra estudada está em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela – 6 Resultados da genotipagem em pacientes e controles.

	Nº de indivíduos	Nº de alelos	Nº de genótipos	H_o	H_e	P
Pacientes	25	5	7	0,68000	0,70857	0,02875
Controles	23	6	11	0,69565	0,80000	0,01437
Total	48	7	14	0,68750	0,75395	0,06069

H_o : heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada; P: probabilidade de desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

4.3 Segregação do microsatélite nas famílias estudadas

A transmissão mendeliana dos alelos do marcador HumTPO foi observada em pacientes de três famílias diferentes com o objetivo de verificar se existem alelos específicos em cada família. Foram construídos 3 heredogramas com casos familiares dos pacientes portadores de Hipotireoidismo Congênito (Figuras 10 a 12).

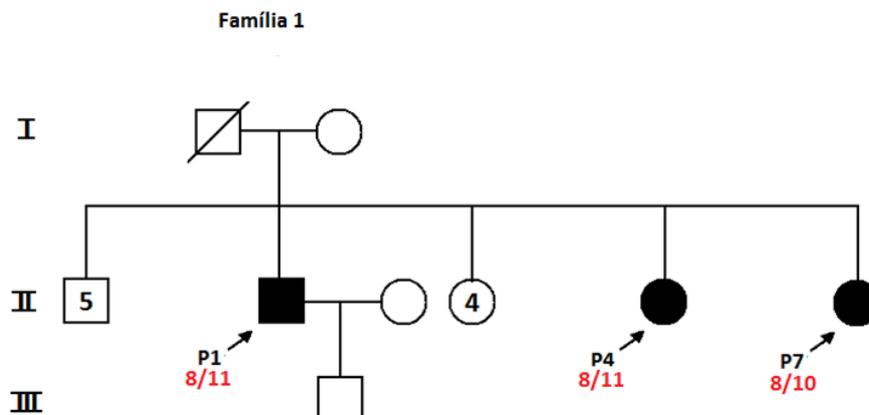


Figura – 11 Heredograma da família 1 da nossa amostra apresentando 3 casos de hipotireoidismo congênito. Os números vermelhos representam os alelos observados nos pacientes.

A família 1 (Figura 11) é originária da cidade de Queimadas e está representada pelos pacientes 1, 4 e 7, todos são irmãos. Os pacientes 1 e 4 possuem o mesmo genótipo (8/11), enquanto que o paciente 7 possui o genótipo 8/10. O genótipo dos pais não foram analisados neste estudo, no entanto, a partir dos dados dos pacientes supracitados, podemos inferir que ao menos um deles possui alelo 8 e o outro possui um alelo 11. O alelo 10 pode ter sido passado por apenas um dos pais ou ainda, estar presente em ambos em heterozigose.

A família 2 (Figura 12) é oriunda da cidade de Boa Vista e está representada pelos pacientes 6, 13, 14 e 18. Na análise do heredograma desta família, observou-se o perfil existente em populações nordestinas de casamentos consanguíneos, principalmente em cidades pequenas, favorecendo o aumento de doenças genéticas raras com padrão de transmissão autossômicas recessiva. Neste heredograma verificamos a presença de tais casamentos em varias gerações, resultando inclusive, no surgimento de HC nos pacientes incluídos neste estudo (P6, P13, P14 e P18). Nesta família, podemos observar a segregação do alelo 8 passado do paciente 18 para o paciente 6. Como este paciente apresenta o alelo 8 em homozigose, podemos inferir que sua mãe (não afetada) possui ao menos um alelo 8. Os pacientes 13 e 14 possuem o mesmo genótipo (8/10) e são resultantes de casamento consanguíneo entre primos de 2º grau.

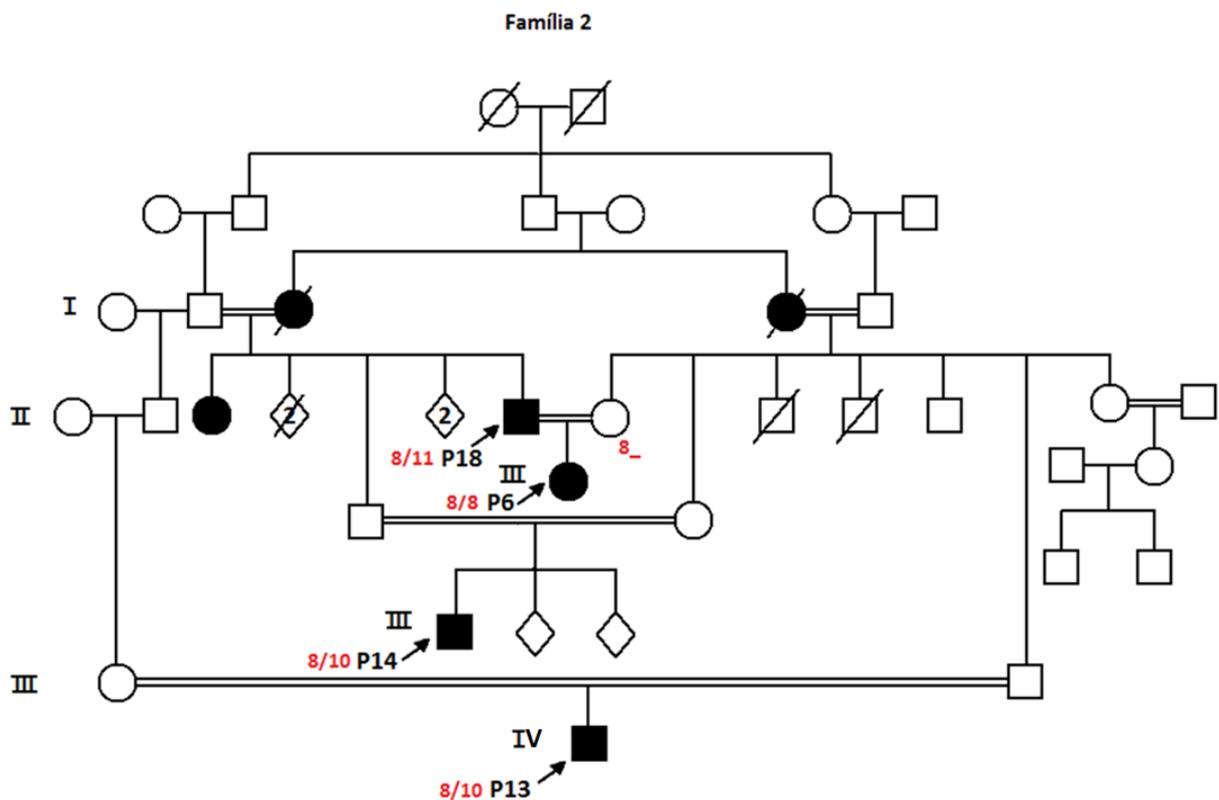


Figura – 12 Heredograma da família 2 da nossa amostra com 4 casos de hipotireoidismo congênito estudados. Os números vermelhos representam os alelos observados nos pacientes.

Analisando o heredograma das famílias 1 e 2 podemos observar uma alta frequência de genótipos 8/10 e 8/11 nos pacientes investigados. No entanto, na família 3 (Figura 13), originária da cidade de Taperoá (P5 e P12), encontramos o único alelo 6 da nossa amostra no paciente 5 (genótipo 6/11) e o alelo 10 em homozigose no paciente 12. A segregação nessa família permite-nos dizer que um dos pais apresenta genótipo 6/10 enquanto que o outro apresenta genótipo 11/10. A partir dos dados das três famílias podemos inferir que os alelos mais frequentes nestas (8>10>11) são também os mais frequentes na população em geral.

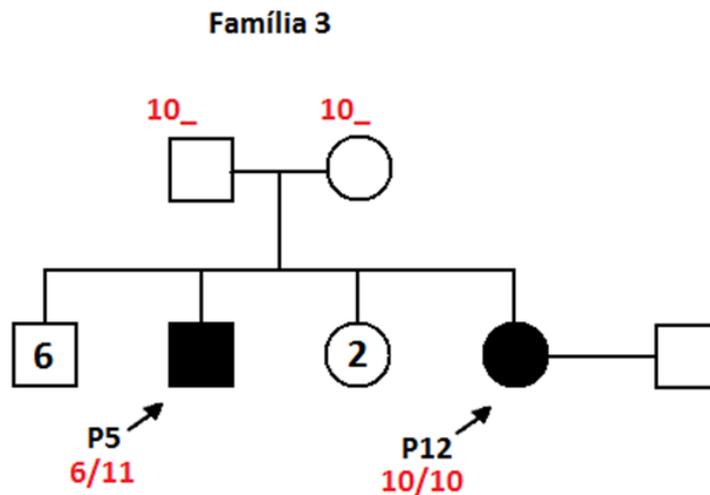


Figura – 13 Heredograma da família 3 da nossa amostra, apresentando 2 casos de hipotireoidismo congênito. Os números vermelhos representam os alelos observados nos pacientes.

4.4 Frequências alélicas do STR HumTPO na população brasileira

As frequências alélicas encontradas no presente estudo foram comparadas com as frequências obtidas em estudos populacionais na Paraíba (GOMES *et al.*, 2007), na região nordeste (CALLEGARI-JACQUES *et al.*; 2003) e no Brasil (AGUIAR, *et al.*, 2011) (Tabela 7). Neste estudo não foram encontrados os alelos 4 e 7, presentes na população da Paraíba, porém encontramos quatro indivíduos com o alelo 13, pouco frequente na população brasileira e ausente no estudo de Gomes *et al.* (2007).

Tabela – 7 Frequências alélicas do STR HumTPO no Brasil e em diferentes regiões sociogeográficas brasileiras.

Alelo HumTPO	Regiões sociogeográficas			
	Brasil	Nordeste	Paraíba	2ª macrorregião de saúde da PB
4	0.000004	-	0.0020	-
5	0.000552	-	-	-
6	0.017713	0,015	0.0220	0.0104
7	0.008404	0,090	0.0080	-
8	0.455862	0,491	0.4230	0.3542
9	0.124117	0,125	0.1320	0.0730
10	0.067302	0,055	0.0760	0.2292
11	0.275532	0,247	0.2670	0.2604
12	0.048123	0,055	0.0700	0.0312
13	0.002173	0,003	-	0.0417
14	0.000122	-	-	-
15	0.000053	-	-	-
16	0.000028	-	-	-
17	0.000008	-	-	-
18	0.000008	-	-	-
n	15	8	7	7
N	123.102	164	323	48
Ho	0.68366	-	0,724	0,6875
He	0.69364	-	-	0,7539
P	< 0.05	-	0,886	0,06069
Alelos mais frequentés	8 > 11 > 9	8 > 11 > 9	8 > 11 > 9	8 > 11 > 10
Referência	AGUIAR, <i>et al.</i> , 2011	CALLEGARI-JACQUES <i>et al.</i> ; 2003	GOMES <i>et al.</i> , 2007	Presente estudo

n: número de alelos encontrados; N: número de indivíduos; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada; P: probabilidade de desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho analisou as frequências alélicas do STR HumTPO em pacientes com HC por disormonogênese e controles, caracterizando os alelos em ambos os grupos a fim de analisar uma possível associação entre o marcador e o HC, além de inferir sobre a variabilidade genética presente na nossa amostra total (N=48).

De acordo com nossos dados não existe associação entre alelos específicos do STR HumTPO e a disormonogênese, apesar da importante função desempenhada pela enzima tireoperoxidase. Porém, é possível, que nas famílias estudadas, as mutações no gene TPO estejam segregando com os alelos 8 e 10 (mais frequentes nas famílias e na população em geral). Isto poderá ser verificado apenas através de uma inferência haplotípica em estudos posteriores. Pirro *et al.* (1995), comparou três grupos de pacientes (Doença de Graves, Tireoidite autoimune e pacientes com bócio nodular sem doença autoimune) e também não encontrou associação alélica entre HumTPO e HC.

Analisou-se também a transmissão mendeliana do marcador HumTPO nas famílias dos pacientes da nossa amostra a fim de verificar se existem alelos específicos em cada família, visto que os pacientes sugerem disormonogênese. Essa condição pode estar associada a mutações nos genes NIS, PDS, TG, THOX, porém, a causa mais comum está relacionada com defeitos no gene TPO (1:40.000) (KNOBEL & MEDEIROS-NETO, 2003). Os resultados obtidos da análise de segregação do marcador constataram que apenas o alelo 6 foi encontrado apenas na família 3 e, os alelos 8, 11 e 10 observados são compartilhados com a população geral. Dados semelhantes foram obtidos em um estudo com uma população portuguesa com o objetivo de rastrear mutações no gene TPO em pacientes com disormonogênese (RODRIGUES, 2004), este estudo verificou que a mutação c.1978C>G segrega com o alelo 8 (mais frequente na população). Estudos posteriores envolvendo o sequenciamento do gene TPO dos nossos pacientes podem revelar se existe ligação entre mutações no gene e alelos específicos do STR HumTPO, visto que o marcador encontra-se no íntron 10 desse gene sofrendo a mesma pressão seletiva e sendo transmitido junto com as mutações em suas respectivas famílias.

A população brasileira é bastante miscigenada, composta principalmente por descendentes ameríndios, africanos e europeus (POIARES *et al.*, 2010). Um reflexo desta miscigenação está no alto número de alelos encontrados para o marcador HumTPO no Brasil (14 alelos ao todo) (AGUIAR, *et al.*, 2011), enquanto que em diversos estudos populacionais realizados em outros países são encontrados de 5 a 7 alelos (DECORTE *et al.*, 2004;

VALLIAN & MOEINI, 2006; TAKESHITA, MEYER & BRINKMANN, 1997). A região Nordeste pode ser caracterizada como mista, tendo origem de indivíduos africanos (17%), europeus (73%) e nativos americanos (10%) (dados de microssatélites) (SIDIA, *et al.*, 2003).

No presente estudo, foram comparados os dados das frequências alélicas da nossa população com os de outros estudos populacionais realizados na Paraíba (GOMES *et al.*, 2007), na região nordeste (CALLEGARI-JACQUES *et al.*; 2003) e no Brasil (AGUIAR, *et al.*, 2011), a fim de inferir sobre a variabilidade genética presente na nossa amostra. Os alelos mais frequentes nas populações brasileiras são o 8, 11 e 9 respectivamente, porém na nossa amostra encontramos o alelo 10 e não o 9 como terceiro mais frequente. Este fato pode ter ocorrido devido ao nosso pequeno tamanho amostral (N= 48) com a inclusão de alguns pacientes oriundos da mesma família ou devido à variações comumente encontradas em estudos populacionais. Exceto as observações já citadas, não foram verificadas diferenças relevantes entre as frequências alélicas do STR HumTPO do nosso estudo e nas demais regiões sociogeográficas brasileiras.

A heterozigosidade observada (H_o) foi de 0,68750 na nossa amostra total (N= 48). Índices semelhantes foram identificados em estudos com amostragem bem maior como no Mato Grosso do Sul com H_o de 0,6635 (N= 208) (SILVA *et al.*, 2004) e Santa Catarina com H_o de 0.6451 (N= 2961) (OCAMPOS *et al.*, 2009), refletindo a grande diversidade genética da população paraibana para este loco. De acordo com os dados obtidos neste estudo, a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p= 0,06069$). Em nossa amostra encontramos com maior frequência o alelo 8, este dado também foi encontrado em todas as populações supracitadas.

Na população estudada encontramos em um dos nossos pacientes o alelo 6, pouco frequente na a população brasileira. Em um estudo de associação utilizando o STR HumTPO entre pacientes com doenças autoimunes da tireóide em uma população italiana, também foi encontrado o alelo 6 em apenas um paciente com a Doença de Graves (PIRRO *et al.*, 1995). Este alelo pode ser muito útil para posterior rastreamento de mutações na família 3, porém, à nível populacional não é possível relacioná-lo com a disormonogênese devido à frequência desse alelo na população brasileira (2%), considerada baixa, porém relevante devido ao grande tamanho amostral (123.102).

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo foi possível verificar que:

- A população estudada apresenta uma grande diversidade genética para o loco HumTPO em comparação com dados do estado, da região e do País;
- A população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg;
- Neste estudo não foi observado associação entre os alelos do STR HumTPO e a disormonogênese nos pacientes da amostra;
- Não foi encontrado diferença significativa entre frequências alélicas entre pacientes e controles.

7. PESPECTIVAS

Estudos posteriores envolvendo o sequenciamento do gene TPO dos pacientes podem revelar se existe relação entre mutações no gene TPO e alelos específicos do STR HumTPO.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, V. R.; WOLFGRAMM, E. de V.; MALTA, F. S.; BOSQUE, A. G.; MAFIA, A. de C.; ALMEIDA, V. C.; CAXITO, F. de A.; PARDINI, V. C.; FERREIRA, A. C.; LOURO, I. D. Updated Brazilian STR allele frequency data using over 100,000 individuals: An analysis of CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, Penta D, Penta E, TH01, TPOX and vWA loci. *Forensic Sci Int Genet.* 6(4), 504-509. 2011.
- ALLANNIC, H.; FAUCHET, R.; LORCY, Y.; HEIM, J.; GUEGUEN, M.; LEGUERRIER, A. M. GENETET, B. HLA and Graves' disease: an association with HLA-DRw3. *J Clin Endocrinol Metab.* 51(4), 863-7. 1980.
- AL-JURAYYAN, N.; EL-DESOUKI, M.; Transient iodine organification defect in infants with ectopic thyroid glands. *Clin Nucl Med.* 22, 13-16. 1997.
- AMORIM, A.; PEREIRA, L. Pros and cons in the use of SNPs in forensic kinship investigation: a comparative analysis with STRs. *Forensic Sci Int.* 150, 17-21. 2005.
- ANKER, R.; STEINBRUECK, T.; DONIS-KELLER. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human thyroid peroxidase (hTPO) locus. *Hum Mol Genet.* 1,137. 1992.
- BAKKER, B.; BIKKER, H.; VULSMA, T.; DE RANDAMIE, J. S.; WIEDIJK, B. M.; DE VIJLDER, J. J. Two decades of screening for congenital hypothyroidism in the Netherlands: TPO gene mutations in total iodide organification defects (an update). *J Clin Endocrinol Metab.* 85, 3708-3712. 2000.
- BEIGUELMAN B. **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações.** 2. ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, p. 180-202, 1995.
- BHARGAVA, A.; FUENTES, F.F. Mutational Dynamics of Microsatellites. *Mol Biotechnol.* 44, 250–266. 2010.
- BONGERS-SCHOKKING, J. J.; KOOT, H. M.; WIERSMA, D.; VERKERK, P. H.; DE MUINCK KEIZER-SCHRAMA, S. M. Influence of timing and dose of thyroid hormone replacement on development in infants with congenital hypothyroidism. *J Pediatr.* 136, 292-297. 2000.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314-331. 1980.
- BUDOWLE, B.; MORETTI, T.R.; Genotype Profiles for Six Population Groups at the 13 CODIS Short Tandem Repeat Core Loci and Other PCRBased Loci. *Forensic Science Communications.* 1(2). 1999.
- CALLEGARI-JACQUES, S. M.; GRATTAPAGLIA, D.; SALZANO, F. M.; SALAMONI, S. P.; CROSSETTI, S. G.; FERREIRA, M. E.; HUTZ, M. H. Historical Genetics: Spatiotemporal Analysis of the Formation of the Brazilian Population. *American journal of human biology.* 15, 824–834. 2003.

CASTANET, M.; POLAK, M.; BONAITI-PELLIE, C.; LYONNET, S.; CZERNICKOW, P.; LEGER, J. Nineteen years of national screening for congenital hypothyroidism: familial cases with thyroid dysgenesis suggest the involvement of genetic factors. **J Clin Endocrinol Metab.** 86, 2009-2014. 2001.

CAVALIERI, R. R. Iodine metabolism and thyroid physiology: current concepts. **Thyroid.** 7(2), 177-181. 1997.

CONGDON, T.; NGUYEN, L. Q.; NOGUEIRA, C. R.; HABIBY, R. L.; MEDEIROS-NETO, G.; KOPP, P. A. novel mutation (Q40P) in PAX8 associated with congenital hypothyroidism and thyroid hypoplasia: evidence for phenotypic variability in mother and child. **J Clin Endocrinol Metab.** 86(8), 3962-3967. 2001.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter.** 19, 299-306. 2001.

DE DEKEN, X.; WANG, D.; MANY, M. C.; COSTAGLIOLA, S.; LIBERT, F.; VASSART, G.; *et al.* Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. **J Biol Chem.** 275(30), 23227-23233. 2000.

DECORTE, R.; ENGELEN, M.; LARNO, L.; NELISSEN, K.; GILISSEN, A.; CASSIMAN, J. Belgian population data for 15 STR loci (AmpFI STR1 SGM Plus and AmpFI STR1 M profler PCR amplification kit). **Forensic Science International.** 139, 211–213. 2004.

DELADOEY, J.; PFARR, N.; VUISSOZ, J. M.; *et al.* Pseudodominant inheritance of goitrous congenital hypothyroidism caused by TPO mutations: molecular and in silico studies. **J Clin Endocrinol Metab.** 93, 627–633. 2008.

DELANGE, F. Neonatal screening for congenital hypothyroidism: results and perspectives. **Horm Res.** 48, 51-61. 1997.

DE LA VIEJA, A.; DOHAN, O.; LEVY, O. Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. **Physiol Rev.** 80(3), 1083-105. 2000.

DEGROOT, L. J.; NIEPOMNISZCZE, H. Biosynthesis of thyroid hormone: Basic and clinical aspects. **Metabolism.** 26, 665-718. 1977.

DELADOEY, J.; BELANGER, N.; VAN VLIET, G. Random variability in congenital hypothyroidism from thyroid dysgenesis over 16 years in Quebec. **J Clin Endocrinol Metab.** 92(8), 3158–3161. 2007.

DE VIJLDER, J. J. M.; VULSMA, T.; RIS-STALPERS, C. Genetic defects in thyroid hormone supply. In: **Thyroid Manager**, electronic edition. Eds DEGROOT L. J. & HENNEMAN G. www.thyroidmanager.org. 2003.

DUNN, A. D.; CRUTCHFIELD, H. E.; DUNN, J. T. Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsins B, D, and L. **J Biol Chem.** 266(30), 20198-204. 1991.

DUNN, J. T.; DUNN, A. Update on intrathyroidal iodine metabolism. **Thyroid**. 11(5), 407-414. 2001.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequence with complex evolution. **Nature reviews – Genetics**. 5, 435-445. 2004.

ENDO Y, ONOGI S, UMEKI K, YAMAMOTO I, KOTANI T, OHTAKI S & FUJITA T. Regional localization of the gene for thyroid peroxidase to human chromosome 2p25 and mouse chromosome 12C. **Genomics**. 25, 760–761. 1995.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**. 10, 564-567. 2010.

FAGMAN, H.; ANDERSSON, L.; NILSSON, M. The Developing Mouse Thyroid: Embryonic Vessel Contacts and Parenchymal Growth Pattern During Specification, Budding, Migration, and Lobulation. **Developmental dynamics**. 235, 444-455. 2006.

FAGMAN, H.; NILSSON, M. Morphogenesis of the thyroid gland. **Mol Cell Endocrinol**. 323 (1), 35-54. 2010.

FARID, N. R.; SAMPSON, L.; NOEL, E. P.; BARNARD, J. M.; MANDEVILLE, R.; LARSEN, B.; MARSHALL, W; H.; CARTER, N. D. A Study of Human Leukocyte D Locus Related Antigens in Graves' Disease. **J Clin Invest**. 63(1), 108–113. 1979.

FUGAZZOLA, L.; MANNAVOLA, D.; VIGONE, M. C.; CIRELLO, V.; WEBER, G.; BECK-PECCOZ, P.; PERSANI, L. Total iodide organification defect: clinical and molecular characterization of an Italian family. **Thyroid**. 15, 1085–1088. 2005.

GAUDINO, R.; GAREL, C.; CZERNICHOW, P.; LEGER, J. Proportion of various types of thyroid disorders among newborns with congenital hypothyroidism and normally located gland: a regional cohort study. **ClinEndocrinol(Oxf)**. 62(4), 444-448. 2005.

GNIDEHOU, S.; CAILLOU, B.; TALBOT, M.; OHAYON, R.; *et al.* Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site. **The FASEB Journal**. 18, 1574-1576. 2004.

GOLDSTEIN, D. B.; LINARES, A. R.; CAVALLI-SFORZA, L. L.; FELDMAN, M. W. Genetic absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans. **Proc Nat Acad Sci**. 92, 6723-6727. 1995.

GOMES, A. V.; MAURICIO-DA-SILVA, L.; RAPOSO, G.; VIEIRA, J. R. C.; SILVA, R. dos S. 13 STR loci frequencies in the population from Paraíba, Northeast Brazil. **Forensic Science International**. 173, 231–234. 2007.

GRANT, D. B.; SMITH, I.; FUGGLE, P. W.; TOKAR, S.; CHAPPLE, J. Congenital hypothyroidism detected by neonatal screening: relationship between biochemical severity and early clinical features. **Arch Dis Child**. 67(1), 87–90. 1992.

GRASBERGER, H.; REFETOFF, S. Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dysmorphogenesis. *Current Opinion in Pediatrics*. 23,421–428. 2011.

GREENBERG, D. A. Linkage Analysis of "Necessary" Disease Loci versus "Susceptibility" Loci. *Am. J. Hum. Genet.* 52,135-143. 1993.

HENDERSON, S. T.; PETES, T. D. Instability of Simple Sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 12(6), 2749-2757. 1992.

JACOB, S.; PRAZ, F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie*. 84, 27-47. 2002.

JORDAN, N.; WILLIAMS, N.; GREGORY, J. W.; EVANS, C.; OWEN, M.; LUDGATE, M. The W546X mutation of the thyrotropin receptor gene: potential major contributor to thyroid dysfunction in a Caucasian population. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 88, 1002–1005. 2003.

JORDE, L. B.; WATKINS, W. S.; BAMSHAD, M. J. Population genomics: a bridge from evolutionary history to genetics medicine. *Hum Mol Genet.* 10, 2199-2207. 2001.

KAMBE, F.; SEO, H. Thyroid-specific transcription factors. *Endocr J.* 44, 775-84. 1997.
 KAYSER, M.; ROEWER, L.; HEDMAN, M.; HENKE, L.; HENKE, J.; BRAUER, S.; KRÜGER, C.; KRAWCZAK, M. *et al.* Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. *Am J Hum Genet.* 66(5), 1580–1588. 2000.

KIMPTON, C. P.; GILL, P.; WALTON, A.; URQUHART, A.; MILLICAN, E. S.; ADAMS, M. Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Meth. Appl.* 3, 13-22. 1993.

KIMURA S, KOTANI T, MCBRIDE OW, UMEKI K, HIRAI K, NAKAYAMA T & OHTAKI S. Human thyroid peroxidase: complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping, and identification of two alternative spliced mRNAs. *PNAS.* 84, 5555–5559. 1987.

KLETT, M. Epidemiology of congenital hypothyroidism. *Exp Clin Endocrinol Diab.* 105, 19-23. 1997.

KNOBEL, M.; MEDEIROS-NETO, G. Na outline of inherited disorders of the thyroid hormone generating system. *Thyroid.* 13(6), 771-801. 2003.

KNOBEL, M.; NOGUEIRA, C. R.; MEDEIROS-NETO, G. Genética molecular do hipotireoidismo congênito. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 45(1). 2001.

LAFRANCHI, S. Detecção neonatal de hipotireoidismo congênito: Uma história de sucesso? *Arq Bras Endocrinol Metab.* 39, 80-8. 1995.

LAFRANCHI, S. Recent developments in pediatric thyroidology. *Thyroid Today.* 21, 1-13. 1998.

LEITE, Fabio Pereira das Neves. **Análise da estrutura genética da população do Rio Grande do Sul através de microssatélites autossômicos e de cromossomos sexuais.** Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências UFRS, RS. 2006.

LI, Y. C.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Mol Ecol.** 11(12), 2453-2465. 2004.

LOMENICK, J. P.; JACKSON, W. A.; BACKELJAUW, P. F. Amiodarone-induced neonatal hypothyroidism: a unique form of transient early-onset hypothyroidism. **JPerinatol.** 24(6), 397-399. 2004.

LOHMUELLER, K. E.; INDAP, A. R.; SCHMIDT, S.; BOYKO, A. R.; HERNANDEZ, R. D.; HUBISZ, M. J.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. *et al.* Proportionally more deleterious genetic variation in European than in African populations. **Nature.** 451, 994–997. 2008.

MARTINS, Joyce Aparecida. **Estudo de frequências alélicas de STRs do cromossomo x na população brasileira de Araraquara-SP.** Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, SP, 2008.

MAUCHAMP, J.; MIRRIONE, A.; ALQUIER, C.; ANDRÉ, F. Follicle-like structure and polarized monolayer: Role of the extracellular matrix on thyroid cell organization in primary culture. **Biology of the Cell.** 90, 369-380. 1998.

MEDEIROS-NETO, G.; KNOBEL, M. Fisiologia da Tireóide. *In:* WAJCHENBERG, Bernardo Leo. (Org.). **Tratado de Endocrinologia Clínica.** 1. ed. São Paulo: Roca, p. 297-307. 1992.

MENDIVE, F. M.; RIVOLTA, C. M.; MOYA, C. M.; VASSART, G.; TARGOVNIK, H. M. Genomic organization of the human thyroglobulin gene: the complete intron-exon structure. **Eur J Endocrinol.** 145, 485-96. 2001.

MEZALIRA, Paola Rossi. **Rastreamento e estudo funcional de alterações no gene da tireoperoxidase associadas ao hipotireoidismo congênito com defeito parcial de incorporação de iodeto.** Dissertação (Mestrado em Endocrinologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, SP, 2010.

MOORE, K. L. Fundamentos de anatomia clínica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 501. 2004.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology.** 55, 335-350. 1987.

NASCIMENTO, A. C.; GUEDES, D. R.; SANTOS, C. S.; KNOBEL, M.; RUBIO, I. G.; MEDEIROS-NETO, G. Thyroperoxidase gene mutations in congenital goitrous hypothyroidism with total and partial iodide organification defect. **Thyroid.** 13, 1145–1151. 2003.

NETCHINE, I.; SOBRIER, M. L.; KRUDE, H.; SCHNABEL, D.; MAGHNIE, M.; MARCOS, E; *et al.* Mutations in HLX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. **Nat Genet.** 25, 182-6. 2000.

OCAMPOS, M.; FERNANDES, R. C.; LATORRE, A. F. S.; SILVA, C. M. D. da.; Korndorfer, F. P. *et al.* 15 STR loci frequencies in the population from Santa Catarina, Southern Brazil. **Forensic Science International: Genetics.** 3, 129–131. 2009.]

OHTA, T.; M. KIMURA. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a genetic population. **Genet. Res.** 22, 201-204. 1973.

OLIVEIRA, Adriana Silva. **Transporte de Hormônios Tiroideanos em Hemácias de Pacientes com Hipertireoidismo ou Hipotireoidismo Primário.** Tese (Doutor em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, DF, 2009.

PACAUD, D.; HUOT, C.; GATTEREAU, A.; BROWN, R. S.; GLORIEUX, J.; DUSSAULT, J. H.; VAN VLIET, G. Outcome in three siblings with antibody-mediated transient congenital hypothyroidism. **J Pediatr.** 127(2), 275-277. 1995.

PANNAIN, S.; WEISS, R. E.; JACKSON, C. E.; DIAN, D.; BECK, J. C.; SHEFFIELD, V.C.; COX, N.; REFETOFF, S. Two different mutations in the thyroid peroxidase gene of a large inbred Amish kindred: power and limits of homozygosity mapping. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.** 84, 1061–1071. 1999.

PARK, S. M.; CHATTERJEE, V. K. K. Genetics of congenital hypothyroidism. **Jornal of Medical Genetics.** 42(5), 379–389. 2005.

PERONE, D.; TEIXEIRA, S. S.; CLARA, S. A.; SANTOS, D. C. dos; NOGUEIRA, C. R. Aspectos genéticos do hipotireoidismo congênito. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 48 (1), 62-69. 2004.

PIRRO, M. T.; FTLIPPIS, V. de.; DI CERBO, A.; SCILLITANI, A.; LIUZZI, A.; TASSI, V. Thyroperoxidase Microsatellite Polymorphism in Thyroid Diseases. **Thyroid.** 5(6). 1995.

POIARES, L. de A.; OSORIO, P. de S.; SPANHOL, F. A.; COLTRE, S. C.; RODENBUSCH, R. *et al.* Allele frequencies of 15 STRs in a representative sample of the Brazilian population. **Forensic Science International: Genetics.** 4, 61–63. 2010.

RADOVICK, S.; NATIONS, M.; DU, Y.; BERG, L. A.; WEINTRAUB, B. D.; WONDISFORD, F. E. A mutation in the POU-homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. **Science.** 257(5073), 1115-1118. 1992.

RASTOGI, M. V.; LAFRANCHI, S. H.; Congenital hypothyroidism. **Orphanet J Rare Dis.** 5, 17. 2010.

REFETOFF, S.; WEISS, R. E.; USALA, S. J. The syndromes of resistance to thyroid hormone. **Endocr Rev.** 14, 348-99. 1993.

RIS-STALPERS, C.; BIKKER, H. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to TPO mutations. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 322, 38–43. 2010.

ROBERTS, H. E.; MOORE, C. A.; FERNHOFF, P. M.; BROWN, A. L.; KHOURY, M. J. Population study of congenital hypothyroidism and associated birth defects, Atlanta, 1979-1992. **Am J Med Genet**. 71, 29-32. 1997.

RODRIGUES, Carina de Fátima. **Rastreio molecular do gene da peroxidase da tireóide em doentes com hipotireoidismo congênito**. Dissertação [Mestrado em Genética Molecular] - Universidade do Minho. Escola de Ciências, Braga, 2004.

RODRIGUEZ, A. M.; PERRON, B.; LACROIX, L.; CAILLOU, B.; LEBLANC, G.; SCHLUMBERGER, M.; BIDART, J. M.; POURCHER, T. Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. **J Clin Endocrinol Metab**. 87(7), 3500-3. 2002.

SAMBROOK, Joseph; RUSSELL. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. 2001.

SCHUSTER, S. C.; MILLER, W.; RATAN, A.; TOMSHO, L. P.; GIARDINE, B.; KASSON, L. R.; HARRIS, R. S. *et al.* Complete Khoisan and Bantu genomes from southern Africa. **Nature**. 463, 943–947. 2010.

SELVA, K. A.; HARPER, A.; DOWNS, A.; BLASCO, P. A.; FRANCHI, S. H. Neurodevelopmental outcomes in congenital hypothyroidism: comparison of initial T4 dose and time to reach target T4 and TSH. **J Pediatr**. 147, 775-80. 2005.

SHEFFIELD, V. C.; KRAIEM, Z.; BECK, J. C.; NISHIMURA, D.; STONE, E. M.; SALAMEH, M.; *et al.* Pendred syndrome maps to chromosome 7q21-34 and is caused by an intrinsic defect in thyroid iodine organification. **Nat Genet**. 12, 424-6. 1996.

SIDIA, M.; CALLEGARI-JACQUES; GRATTAPAGLIA, D.; SALZANO, F. M.; SALAMONI, S. P.; CROSSETTI, S. G.; FERREIRA, M. E.; HUTZ, M. H. Historical Genetics: Spatiotemporal Analysis of the Formation of the Brazilian Population. **American Journal of Human Biology**. 15, 824–834. 2003.

SILVA, D. A.; CROUSE, C. A.; CHAKRABORTY, R.; GÓES, A. C. S.; CARVALHO, E. F. Statistical analyses of 14 short tandem repeat loci in Brazilian populations from Rio de Janeiro and Mato Grosso do Sul states for forensic and identity testing purposes. **Forensic Science International**. 139, 173–176. 2004.

SOUSA, Claudia Nieves da Silva. **Análise da prevalência do Hipotireoidismo Congênito na Paraíba com dados da triagem neonatal**. Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da Paraíba UEPB, PB. 2011.

STOPPA-VAUCHER, S.; VLIET, G. V.; DELADOËY, J. Variation by Ethnicity in the Prevalence of Congenital Hypothyroidism Due to Thyroid Dysgenesis. **Thyroid**. 21(1). 2011.

STRACHAN, T.; READ, A. P. Instability of the human genome: mutation and DNA repair. In: STRACHAN, T.; READ, A. P. **Human Molecular Genetics**. 2 ed. New York: Wiley-Liss, 1999.

SUBRAMANIAN, S.; MISHRA, R. K.; SINGH, L. Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions. **Genome Biol.** 4(2), 13. 2003

TAKESHITA, H.; MEYER, E.; BRINKMANN, B. The STR loci HumTPO and HumLPL: population genetic data in eight populations. **Int J Legal Med.** 110, 331–333. 1997.

TAUROG, A.; DORRIS, M. L. Peroxidase-catalyzed bromination of tyrosine, thyroglobulin, and bovine sérum albumin: comparison of thyroid peroxidase and lactoperoxidase. **Arch Biochem Biophys.** 287(2), 288-296. 1991.

TENENBAUM-RAKOVER, Y.; MAMANASIRI, S.; RIS-STALPERS, C.; GERMAN, A.; SACK, J.; ALLON-SHALEV, S.; POHLENZ, J.; REFETOFF S. Clinical and genetic characteristics of congenital hypothyroidism due to mutations in the thyroid peroxidase (TPO) gene in Israelis. **Clinical Endocrinology (Oxford).** 66, 695–702. 2007.

THOMAS, P. Q.; DATTANI, M. T.; BRICKMAN, J. M.; MCNAY, D.; WARNE, G.; ZACHARIN, M.; *et al.* Heterozygous HESX1 mutations associated with isolated congenital pituitary hypoplasia and septo-optic dysplasia. **Hum Mol Genet.** 10, 39-45. 2001.

THOMSON, J. A.; PILOTTI, V.; STEVENS, P.; AYRES, K. L.; DEBENHAM, P. G. Validation of short tandem repeat analysis for the investigation of cases of disputed paternity. **Forensic Science International.** 100, 1-16. 1999.

TURKKAHRAMAN, D. ALPER, O. M.; PEHLIVANOGLU, S.; AYDIN, F.; YILDIZ, A.; LULECI, G.; AKCURIN, S.; BIRCAN I. Analysis of TPO gene in Turkish children with iodide organification defect: identification of a novel mutation. **Endocr.** 37, 124–128. 2010.

TWYMAN, R. M; PRIMROSE, S. B. Techniques patents for SNP genotyping. **Pharmacogenomics.** 4, 67-79. 2003.

VAISMAN, M.; ROSENTHAL, D.; CARVALHO, D. P. Enzimas Envolvidas na Organificação Tireoideana do Iodo. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 48(1). 2004.

VALLIAN, S.; MOEINI, H. Genotyping of Five Polymorphic STR Loci in Iranian Province of Isfahan. **Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran.** 17(2), 113-117. 2006.

VASSART, G.; DUMONT, J. E. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. **Endocr Rev.** 13, 596–611. 1992.

VONO-TONIOLO, J.; KOPP, P. Thyroglobulin gene mutations and other genetic defects associated with congenital hypothyroidism. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 48(1). 2004.

WEBER, G.; MORA, S.; PRINA C. L. M.; SIRAGUSA, V.; COLOMBINI, J.; MEDAGLINI, S.; *et al.* Cognitive function and neurophysiological evaluation in early-treated hypothyroid children. **Neurol Sci.** 21, 307-14. 2000.

WREN, J. D.; FORGACS, E.; FONDON, J. W.; PERTSEMLIDIS, A.; CHENG, S. Y.; GALLARDO, T.; WILLIAMS, R. S.; SHOHET, R. V.; GARNER, H. R. Repeat

polymorphisms within gene regions: phenotypic and evolutionary implications. **Am J Hum Genet.** 67, 345-356. 2000.

WU, W. COGAN, J. D.; PFÄFFLE, R. W.; DASEN, J. S.; FRISCH, H.; O'CONNELL, S. M.; *et al.* Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. **Nat Genet.** 18, 147-9. 1998.

YANG, I. D. **Genética médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 120, 1997.