



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA – UEPB
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
LICENCIATURA PLENA E BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RAYANE DA SILVA SOUZA

**PROSPECÇÃO DE MUTAÇÕES NOS ÉXONS 1, 2, 3, 4, 5 E 8A DO
GENE DA TIREOPEROXIDASE (TPO) EM PACIENTES COM
HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO (HC)**

CAMPINA GRANDE – PB
2011

RAYANE DA SILVA SOUZA

PROSPECÇÃO DE MUTAÇÕES NOS ÉXONS 1, 2, 3, 4, 5 E 8A DO GENE DA TIREOPEROXIDASE (TPO) EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO (HC)

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
2011

S729p

Souza, Rayane da Silva.

Prospecção de mutações nos éxons 1, 2, 3, 4, 5 e 8a do gene da tireoperoxidase (TPO) em pacientes com hipotireoidismo congênito (HC) [manuscrito] / Rayane da Silva Souza. – 2011.

65 f.: il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2011.

“Orientação: Profª. Dra. Simone Silva dos Santos Lopes, Departamento de Biologia”.

1.Sistema endócrino. 2. Hipotireoidismo congênito. 3. Hormônios tireoidianos. I. Título.

21. ed. 611.4

RAYANE DA SILVA SOUZA

PROSPECÇÃO DE MUTAÇÕES NOS ÉXONS 1, 2, 3, 4, 5 E 8A DO GENE DA TIREOPEROXIDASE (TPO) EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO (HC)

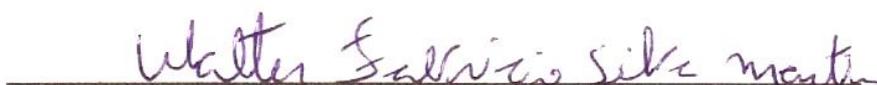
Orientadora: Prof. Dr^a. Simone Silva dos Santos Lopes

Campina Grande, 10 de junho de 2011.
NOTA 10,0 (dez)

BANCA EXAMINADORA


Prof^a. Dra. Simone Silva dos Santos Lopes
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB


Prof^a. Dra. Silvana Cristina dos Santos
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB


Prof. M.Sc Walter Fabrício Silva Martins
Universidade Estadual da Paraíba – UEPB

DEDICO ESTE TRABALHO

ao amigo infalível.

Jesus Cristo – não mereço Teu amor e Tua amizade!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua graça e bondade e por me mostrar que posso ir além. Por está ao meu lado em momentos felizes e por me carregar nos braços em dificuldades, quando me senti fraca e impotente. Não mereço Tua entrega por mim e Teu amor. Só me resta dizer: sou imereçedora! A Ti tributo cada conquista em minha vida, pois não me pertencem, são Tuas!

Aos meus pais, que me educaram e me ensinaram importantes valores para vida, os quais se esforçaram para dá sempre o melhor que podiam. Meus irmãos, Rafaelle e Rivaldo, amo muito vocês! (Pai, obrigada por me transportar inúmeras vezes em sua bicicleta para UEPB! Mãe, obrigada pelo afeto e pelas vezes que preparastes meu almoço às 6hs da manhã!).

À prof.^a Dr.^a Simone Silva dos Santos Lopes, obrigada pela oportunidade que me destes durante todo este tempo, pelo conhecimento compartilhado, pela orientação durante os trabalhos, pela humildade como pessoa e educadora. Obrigada por acreditar em mim! (Lembras quando te “segurava” nos corredores da UEPB te pedindo uma vaga no estágio? Numca esquecerei o dia que você disse: Sim!).

Às companheiras de estágio Diana, Rubistênia, Cláudia, Camila, Larrisa, Rayssa (cacheado) e Rayssa (loira). Pela, amizade, cooperação e paciência. (Diana, obrigada por sua sincera amizade por estares sempre disponível. Ruby, com seu jeito “atrapalhado”, como dizias, cativastes minha amizade. Eu, você e Diana fomos as pioneiras!).

A Douglas, por está sempre disponível, pela ajuda, carinho e amizade, pelas idas e vindas à biblioteca, por estares sempre ao meu lado (Você uma das pessoas que me deram força durante o acidente, muito obrigada!).

À Luisa Porto, pelos ensinamentos de conduta laboratorial, pelo convívio, pelas teorias científicas discutidas com uma estagiária!

Aos meus colegas de curso, pelo incentivo, companheirismo e momentos juntos. (Hugo, Tarciso e Milton, vocês foram fundamentais no momento da Bíblia e maravilhosos irmãos! Sílvia, você é pessoa muito especial e és uma amizade sadia! Tardeli você é um dos amigos que carrego sempre no coração! Anny, você é alguém ajudadora e sincera, és uma vencedora! Jéssica, com uma maneira linda, me conquistaste, és genial! Laís, dos cabelos de chocolate, és muito amada, sobretudo

por Deus! Ingrid, a Índia da turma, você pode e irá chegar onde queres! Bruno, obrigada pelos momentos que passamos juntos no cursinho UFCG, caronas, caminhadas do Senai para casa a pé! Crhis, você é surpreendentemente esforçada! Sara e Talita, tenho-as sempre em meu coração, obrigada pelo apoio durante o acidente).

À direção do BIOMOL, por nos abrirem as portas. Ionara, Wellisson, Francisco e Mônica, obrigada pelo apoio direto, pelos almoços compartilhados, pela incassável gentileza!

À banca examinadora por ter aceitado o convite e pela disponibilidade.

À prof^a. Cibelle Flávia, que sempre esteve disponível. Pelo aprendizado proporcionado nas aulas de estágio, pelas discussões sobre educação, pelos ajustes no horário no início e final do curso, motivados pelo Redentorista e pelo acidente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo auxílio financeiro a PROPESQ pela concessão do projeto.

À Universidade Estadual da Paraíba, à coordenação e aos professores do Departamento de Ciências Biológicas, pelo grande aprendizado que me proporcionaram ao longo desses quatro anos.

A todos que participaram direta e indiretamente. Meu mais sincero OBRIGADO!

“Existem mais coisas entre o céu e a terra do que supõe nossa vã filosofia...”

(Shakespeare)

“Há coisas que não sabemos, e elas pertencem ao Eterno, o nosso Deus; mas o que Ele revelou (...) é para nós e para os nossos descendentes, para sempre ...”

(Deuteronômio 29:29)

RESUMO

O Hipotireoidismo Congênito (HC) é o distúrbio endócrino apontado como a causa mais comum de retardo mental passível de prevenção e se deve a ausência ou deficiência na produção dos hormônios tireoidianos (HTs), sendo a prevalência de 1/3000 a 1/4000. Na biossíntese dos HTs, a Tireoperoxidase (TPO) é a enzima chave por catalizar importantes reações. Mutações neste gene são consideradas a principal causa de HC por disormonogênese. Diante disto, se propôs no presente trabalho prospectar mutações nos éxons 1, 2, 3, 4, 5 e 8a em pacientes com HC provenientes de diferentes municípios do estado da Paraíba (2ª macrorregião de saúde), através do método PCR-SSCP. A amostragem foi constituída por 25 pacientes diagnosticados com HC e 22 controles. A técnica de PCR foi padronizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores de DNA descritos por Rodrigues et al., (2005). No total, foram observados 17 padrões eletroforéticos distribuídos nos 6 éxons: 8 perfis são prováveis mutações encontrados somente em pacientes. Os demais perfis são *standard*, observados nos dois grupos. As prováveis mutações e suas respectivas frequências foram observados nos éxons 1 (perfil 3 - 8%), 2 (perfil 2 - 4%), 3 (perfis 2 e 3 - 12%, cada), 4 (perfil 2 - 4%), 5 (perfil 3 - 4%) e 8a (perfis 2 e 4 - 8% e 12%, respectivamente). Variantes polimórficas foram observadas nos éxons 1 (perfil 2 - pacientes 16%, e controles 5%) e 5 (perfil 2 - pacientes 24%, e controles 27%). O éxon mais polimórfico foi o 8a, o qual apresentou 4 padrões. Dentre os casos familiares, a família 3 apresentou maior número de éxons com padrões alterados: éxons 2, 3 e 8a. Casos esporádicos também apresentaram perfis com padrão de migração alterado em diferentes éxons: P3 (éxons 1 e 5), P16 (éxons 1 e 3), P17 (éxons 5 e 8a) e P25 (éxons 3 e 4). A técnica de SSCP mostrou-se eficiente na prospecção das mutações e os dados obtidos permitem concluir que tanto os casos familiares quanto os casos esporádicos para HC aqui amostrados carregam mutações e polimorfismos nos diferentes éxons analisados. Estas alterações possivelmente ocasionam mudança na sequência nucleotídica da proteína e provavelmente estão relacionadas ao fenótipo apresentado pelos pacientes. Pelas características da população amostrada, fatores como as relações familiares e o efeito fundador podem estar relacionados a ocorrência de HC. A natureza genética das alterações serão elucidadas através de sequenciamento.

PALAVRAS-CHAVE: hormônios tireoidianos, disormonogênese, PCR, SSCP, polimorfismo.

ABSTRACT

The Congenital Hypothyroidism (CH) is an endocrine disorder named as the most common cause of preventable mental retardation and is due to absence or deficiency in the production of thyroid hormones (TH), a prevalence of 1 / 3000 to 1 / 4000. In the biosynthesis of HTs, the thyroperoxidase (TPO) is the key enzyme for catalyzing important reactions. Mutations in this gene are considered the major cause of HC by dysmorphogenesis. Therefore, we proposed in this paper exploring mutations in exons 1, 2, 3, 4, 5 and 8a in patients with HC from different municipalities in the state of Paraíba (2nd macroregion health) by PCR-SSCP. The sample comprised 25 patients diagnosed with HC and 22 controls. The PCR was standardized using the DNA primers described by Rodrigues et al. (2005). A total of 17 electrophoretic patterns were observed distributed in 6 exons: 8 profiles are likely to mutations found only in patients. Other standard profiles are observed in both groups. The probable mutations and their frequencies were observed in exons 1 (profile 3 - 8%), 2 (Profile 2 - 4%), 3 (Profiles 2 and 3 - 12% each), 4 (Profile 2 - 4%) , 5 (Profile 3 - 4%) and eighth (sections 2 and 4 - 8% and 12% respectively). Polymorphic variants were observed in exons 1 (profile 2 - 16% of patients and controls 5%) and 5 (Profile 2 - 24% patients, and controls 27%). The most polymorphic exon was the eighth, which showed four patterns. Among the familial cases, family 3 showed the largest number of exons with altered patterns: exons 2, 3 and eighth. Sporadic cases also had profiles with altered migration pattern in different exons: P3 (exons 1 and 5), P16 (exons 1 and 3), P17 (exons 5 and 8a) and P25 (exons 3 and 4). The SSCP technique was efficient in the exploration of changes and the data obtained showed that both the family cases and sporadic cases sampled here for HC carry mutations and polymorphisms in different exons analyzed. These changes probably cause changes in the nucleotide sequence of the protein and are probably related to the phenotype of the patients. Characteristics of the sampled population, factors such as family relations and the founder effect may be related to the occurrence of HC. The nature of genetic changes will be elucidated by sequencing.

KEY WORDS: thyroid hormones, dysmorphogenesis, PCR, SSCP polymorphism.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação e etiologia do Hipotireoidismo Congênito	24
Tabela 2 - Iniciadores utilizados na amplificação dos éxons 1, 2, 3, 4, 5, 8a do TPO.	36
Tabela 3 – Composição dos tampões de calibração da reação de PCR do <i>kit</i> Phoneutria.....	37
Tabela 4 – Éxon e tampão específico.....	42
Tabela 5 – Número de perfis por éxon, perfis alterados e indivíduos portadores.....	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Frequência dos perfis no éxon 1.....	43
Gráfico 2- Frequência dos perfis no éxon 2.....	44
Gráfico 3 - Frequência dos perfis no éxon 3.....	45
Gráfico 4 - Frequência dos perfis no éxon 4.....	46
Gráfico 5 - Frequência dos perfis no éxon 5.....	47
Gráfico 6 - Frequência dos perfis no éxon 8a.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo da biossíntese dos hormônios da tireóide	17
Figura 2 - Regulação da síntese e secreção dos hormônios da tireóide - Eixo hipotalâmico-hipofisiário-tiroideu	18
Figura 3 - Esquema representativo da estrutura do gene TPO.....	28
Figura 4 – Esquema do gene TPO com as mutações relatadas até o presente momento	29
Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1% com amostras da extração de DNA genômico de 18 pacientes	39
Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 1% com amostras da extração de DNA genômico de 15 controles	39
Figura 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% com amostras da amplificação dos éxons 1, 2, 3, 4, 5 e 8a	41
Figura 8 - gel de SSCP em glicerol 5%. Éxon 1 (Pacientes).....	43
Figura 9 - gel de SSCP em glicerol 5%. Éxon 1 - pacientes (complemento).....	43
Figura 10 - gel de SSCP em glicerol 5%. Éxon 2 (Pacientes)	44
Figura 11 - gel de SSCP em glicerol 5%. Éxon 3 (Pacientes).....	45
Figura 12 - gel de SSCP em glicerol 5%. Éxon 4 (Pacientes)	46
Figura 13 - gel de SSCP em glicerol 5%. Éxon 5 (Pacientes)	47
Figura 14 - gel de SSCP em glicerol 5%. Éxon 8a (Pacientes)	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 Aspectos gerais da glândula tireóide	15
2.1.1 Biossíntese.....	16
2.1.2 Regulação da atividade secretora da glândula.....	17
2.1.3 Ação periférica dos hormônios tireóideos	18
2.2 Hipotireoidismo.....	19
2.2.1 Hipotireoidismo congênito	21
2.2.2 Programa Nacional de Triagem Neonatal e o HC.....	22
2.2.3 Classificação e etiologia do HC.....	23
2.3 Aspectos genéticos do HC	25
2.3.1 Genes relacionados a digenesia	25
2.3.2 Genes relacionados a disormonogênese	26
2.4 Enzima Tireoperoxidase – aspectos moleculares	27
2.5 Rastreamento de mutações	29
2.5.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	30
2.5.2 <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> (SSCP).....	33
3 METODOLOGIA	35
3.1 Local de estudo e amostragem	35
3.2 Coleta das amostras.....	35
3.3 Extração de DNA.....	36
3.4 Padronização da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	36
3.5 Eletroforese	37
3.6 Análise do gene TPO por SSCP	38
3.7 Análise estatística.....	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Extração de DNA.....	39
4.2 Padronização da reação de PCR	40
4.3 Análise em SSCP	42
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÃO	56
7 PERSPECTIVAS	57
REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

O Hipotireoidismo Congênito (HC) é a síndrome resultante da deficiência ou ausência dos hormônios tireoidianos (HTs), os quais regulam distintos processos metabólicos (DOUGLAS, 2006; RAMOS et al., 2003). A ausência ou tratamento tardio ocasiona consequências graves, como a deficiência no desenvolvimento psicomotor e retardo mental (PEZZUTI et al., 2009).

Dependendo do mecanismo envolvido, o HC pode ser classificado em digenesia e hormonogênese. O tipo mais comum de HC por disormonogênese se dá por defeitos no gene TPO, para o qual há inúmeras mutações descritas. Este gene codifica a proteína Tireoperoxidase, envolvida em mecanismos essenciais da biossíntese dos HTs (SIMM et al., 2009).

Mutações em qualquer dos éxons do gene TPO resulta em HC e o fenótipo pode variar de leve a grave, dependendo da natureza da mutação (STALPERS e BIKKER, 2010). Isso demonstra a importância de estudos que aprofundem o conhecimento relacionado ao gene e aos fenótipos associados às alterações na estrutura da proteína.

O avanço da biologia molecular favoreceu o desenvolvimento de técnicas eficazes que possibilitam o rastreamento de mutações genéticas, entre as quais se destacam o método PCR-SSCP, apontado como de alta sensibilidade para detecção e análise de mutações de ponto (SHEFFIELD, 1993).

Diante das considerações supracitadas no respectivo trabalho se propôs realizar o rastreamento de mutações nos éxons 1, 2, 3, 4, 5 e 8a do gene em pacientes com HC provenientes de diferentes municípios do estado da Paraíba (2ª macrorregião de saúde).

O estudo é uma proposta de um projeto com grandes proporções, que visa o estudo molecular para o levantamento das frequências de mutações e polimorfismos no gene na população referida. Como parte desta proposta, posteriormente a análise molecular, se busca a elaboração de um método diagnóstico para detecção rápida de HC e a implementação de programas de aconselhamento genético para orientação às famílias envolvidas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da glândula tireóide

A tireóide é a primeira glândula endócrina que surge durante o desenvolvimento embrionário. Sua organogênese tem início a partir do espessamento endodérmico (divertículo tireóideo) mediano no assoalho da faringe primitiva. Este primórdio tireoidiano desenvolve-se tornando-se bilobulado e migra caudalmente se posicionando na região cervical. A tireóide embionária assume sua forma definitiva entre a 8ª ou 9ª semana da gestação (PARK & CHATTERJEE, 2005). A localização final se dá imediatamente abaixo da laringe, em ambos os lados da traquéia, isto é, bilobulada e conectada por um istmo, na sua parte anterior (GUYTON, 1992).

A unidade funcional básica da glândula é o folículo, constituído por células que se reúnem em esferas, de formato cuboidal, circundadas pela membrana basal. O lúmen folicular contém uma substância de composição viscosa – o colóide. Os folículos são circundados por uma rede capilar extremamente rica e terminações nervosas simpáticas e parassimpáticas. A principal função das células foliculares é a produção dos hormônios tireoidianos (HTs), a 3,5,3',5'tetraiodotironina (tiroxina ou T_4) e a 3,5,3' triiodotironina (T_3), que exercem profundos efeitos, aumentando o metabolismo do organismo. A tireoglobulina (Tg) é a precursora destes hormônios, uma glicoproteína de elevado peso molecular (660 kD) contida no espaço folicular e armazenada no colóide. Esta proteína contém aproximadamente 110 resíduos do aminoácido tirosina. Esta é a unidade que formará a base de síntese dos HTs (MEDEIROS-NETO e KNOBEL, 1992). A glândula também secreta a calcitonina, um importante hormônio relacionado ao metabolismo do cálcio (GUYTON, 1992).

No processo de síntese dos HTs, as unidades de tirosina são halogenadas por ligações ao elemento iodo (I_2), um componente essencial dos HTs que, entretanto, não é biossintetizado. Isso explica a necessidade do aporte diário de iodo, o qual é obtido na dieta. Este elemento liga-se aos anéis fenólicos dos resíduos de tirosina da Tg para dar origem a iodotirosinas, a monoiodotirosina (MIT) e a diiodotirosina (DIT), que são unidades dos HTs. Para que haja uma produção normal destes hormônios é necessário o desenvolvimento normal da glândula, funcionamento e regulação adequados do mecanismo de biossíntese e captação

adequada do iodo (DOHÁN e CARRASCO, 2003).

2.1.1 Biossíntese dos hormônios tireoidianos

O iodo obtido na nutrição é absorvido no trato gastro-intestinal e transformado em iodeto sendo rapidamente captado pelos tireócitos a partir da corrente sanguínea. Esse processo precede o início da síntese dos HTs (MEDEIROS-NETO e KNOBEL, 1992).

A hormonogênese se inicia com o transporte ativo do iodeto presente na corrente sanguínea para o interior das células foliculares dos tireócitos através do Simportador Sódio e Iodeto (Na^+ / I^- ou NIS). NIS é uma glicoproteína transmembrana que medeia a captação ativa do I^- da região basal para o lúmen do tireócito, constituindo um passo crucial para produção dos HTs (DAI et al., 1996). Do citoplasma, o I^- é transportado para a região apical do tireócito por ação da proteína de membrana Pendrina (PDS) (KOPP, 2000).

Na porção luminal da membrana apical ocorrem etapas cruciais à síntese dos HTs: oxidação de íons I^- , iodação da Tg e *coupling*. Estas reações são catalisadas por uma hemoproteína apontada como a enzima principal na hormonogênese, a Tireoperoxidase (TPO) (KOTANI et al., 2003).

Após a interiorização do iodeto, processa-se a reação oxidativa realizada pela TPO. Nesta reação ocorre a conversão dos íons de iodeto em uma forma oxidada do iodo, nas formas de iodo nascente (I^0) ou como (I_3^-), que é capaz de se combinar diretamente com o aminoácido tirosina (GUYTON, 1992).

A TPO atua na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é requerido como substrato da reação enzimática como acceptor final de elétrons, recebendo a carga negativa do iodeto. Portanto, é um fator essencial que atua também no *coupling* e é gerado pelo sistema DUOX_2 (DE DEKEN et al., 2002).

Em seguida a TPO catalisa a incorporação do iodo aos resíduos tirosil da cadeia peptídica da Tg, processo chamado de organificação da Tg, que conduz a formação das iodotirosinas – monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT) – as quais são conjugadas também por ação da TPO (o *coupling*). Da ligação de uma MIT e uma DIT resulta T_3 e da união de duas DIT, T_4 (GUYTON, 1992).

Para que ocorra a liberação das iodotirosinas é necessário que ocorra a reabsorção de colóide contendo Tg para dentro dos tireócitos. Nesse processo, são

formados pseudópodes na superfície apical da célula, estendendo-se ao colóide e gotículas são interiorizadas por endocitose. Os lisossomos, os quais contêm as enzimas que realizam a clivagem proteolítica da Tg, fundem-se com as gotículas do colóide formando o fagolisossomo. Deste, são liberados T₃, T₄, MIT e DIT (MEDEIROS-NETO e KNOBEL, 1992)

As moléculas de MIT e DIT não utilizadas na síntese dos hormônios permanecem nas células e são desalogenadas por ação da enzima desalogenase (DEHAL) desidase e o iodo liberado é reinserido nas vias produtoras dos hormônios. Os hormônios T₃ e T₄ entram na circulação sistêmica (Figura 1) (GNIDEHOU et al., 2002).

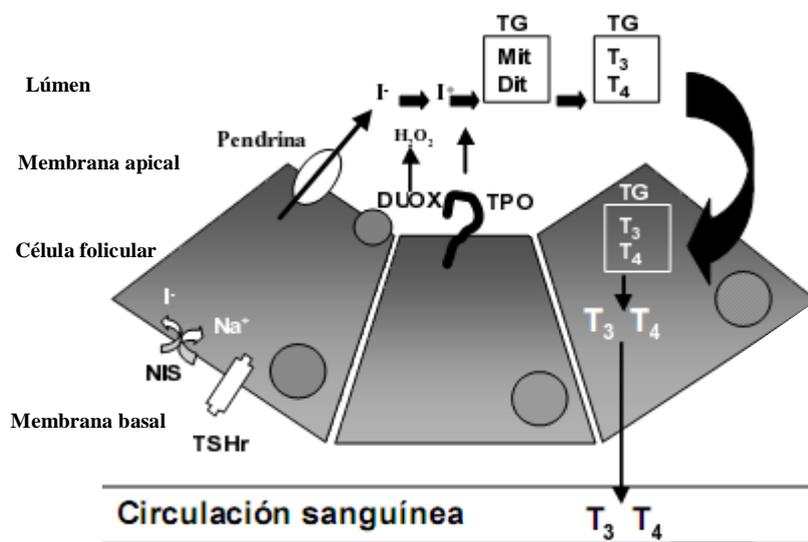


Figura 1 – Esquema representativo da biossíntese dos hormônios da tireóide (adaptado de RIVOLTA et al., 2005).

2.1.2 Regulação da atividade secretora da glândula

Diferentes mecanismos regulam a secreção dos HTs. O excesso de iodo intratireóideo diminui o transporte de iodeto (auto regulação tireóidea), a resposta da célula tireóidea ao TSH e a organificação do iodo. Também bloqueia a síntese da TPO, a proteólise e a secreção hormonal. O bloqueio da organificação do iodo ocorre na presença de altas concentrações deste componente e corresponde ao efeito Wolff-Chaikoff (VAISMAN et al., 2004).

Os HTs T₃ e T₄ são sintetizados e secretados sob a influência estimulatória da tireotropina hipofisária (Hormônio Estimulante da Tireóide ou TSH). A secreção do

TSH é regulada pelos níveis HTs e pelo hormônio regulador da tiotropina (TRH), portanto, por *feedback* negativo (SINGER, 2006). O TRH é um tripeptídeo presente em elevada concentração no hipotálamo, que quando estimulado, libera-o e atinge a hipófise, estimulando a síntese e liberação do TSH. Sua ação implica em fixação em um receptor membranal específico, o receptor de TSH (rTSH), estimulando a elevação na secreção dos hormônios (MEDEIROS-NETO e KNOBEL, 1992).

Quando há carência de iodo por baixa ingestão, é produzido o bócio, o qual deve-se à escassa formação dos HTs, que não bloqueando a hipófise, aumenta compensatoriamente a secreção de TSH, estimulando a glândula tireóide, a qual exarceba e incrementa o volume, constituindo o bócio (DOUGLAS, 2006).

A figura 2 esquematiza o mecanismo de regulação secreção dos HTs a partir do eixo hipotalâmico-hipofisário.

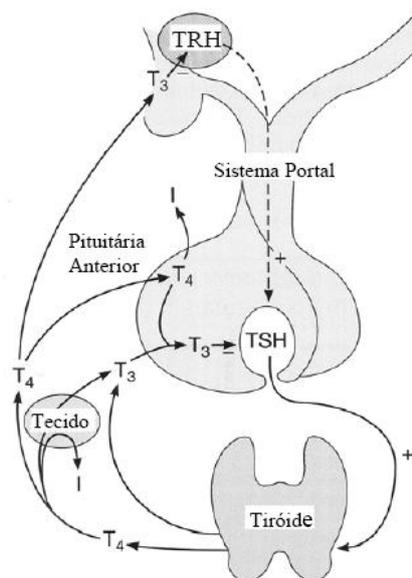


Figura 2 - Regulação da síntese e secreção dos hormônios da tireóide - Eixo hipotalâmico-hipofisário-tireóideu (adaptado de Greenspan, 2004. In RODRIGUES, 2004).

2.1.3 Ação periférica dos hormônios tireóideos

Cerca de 90% do hormônio secretado consiste em T₄, e 10% em T₃. Entretanto, a maior parte de T₄ é convertida em T₃ nos tecidos por retirada de um íon iodeto por desalogenação enzimática (desalogenase tipos I e II). A afinidade de ligação do T₃ com os receptores celulares é muito elevada, e na ligação aos receptores a proporção é a mesma que na secreção. As funções dos hormônios são qualitativamente idênticas, porém eles diferem na rapidez e intensidade de sua ação.

A T_3 é cerca de quatro vezes mais potente que o T_4 , mas em quantidades bem menores na circulação sanguínea e persiste por período de tempo bem menor que T_4 (GUYTON, 1992).

A T_3 fixada ao receptor nuclear associado a cromatina passa a ativar uma série de processos bioquímicos, entre eles a síntese aumentada de RNAm induzindo a síntese protéica, o aumento da passagem de aminoácidos através da membrana celular e estímulo a atividade ATPase, Na^+ dependente na mitocôndria. A T_3 também pode ligar-se a membrana plasmática, mitocôndrias, e provavelmente a outras estruturas celulares. Através destes mecanismos expressa-se um número muito grande de ações que afetam, praticamente, todas as células corporais do organismo, e portanto, todos os sistemas corpóreos se constituem alvo dos HTs (DOUGLAS, 2006).

Os tecidos que mais concentram e que possuem maior afinidade pelos HTs, excetuando-se o tirotrofocito hipofisário, são fígado, rins, músculo e tecido adiposo. O cérebro, o baço e as gônadas concentram menor quantidade e tais diferenças ocorrem em paralelo ao grau de consumo de oxigênio dos tecidos citados. Os HTs atuam no crescimento somático, desenvolvimento cerebral, crescimento e maturação ósseos, erupção e desenvolvimento dentários, sistemas metabólicos, desenvolvimento puberal e na função hipotalâmo-hipofisária (MEDEIROS-NETO e KNOBEL, 1992).

A falta completa de secreção da tireóide provoca, queda do metabolismo basal de até 40% abaixo do normal, enquanto excessos extremos de secreção podem causar elevação do metabolismo basal de até 60 a 100% acima dos valores normais (GUYTON, 1992).

2.2 Hipotireoidismo

O Hipotireoidismo refere-se a síndrome clínica e bioquímica que é resultado da redução dos níveis circulantes dos HTs ou da ausência destes. A incidência na população é de 1 a 2%, podendo ocorrer em todas as idades, com pico de incidência entre 40 e 60 anos. É classificado em Hipotireoidismo Primário (causa tireodiana), Secundário ou Central (causa hipotalâmica-hipofisária) e Terciário (resistência generalizada ao hormônio tireoidiano) (KNOBEL & MEDEIROS-NETO, 1992).

Os HTs estão relacionados a diferentes mecanismos do organismo, e portanto,

sua ausência ou deficiência afetam o desenvolvimento regular de muitos processos celulares, apresentando muitas consequências prejudiciais, conforme descritos por Hershman (2006):

- **Glândula tireóide** - alargamento da glândula nas crianças pequenas com Hipotireoidismo sugere um defeito biossintético. Em adultos, com a presença de bócio, é causado pela tireoidite de Hashimoto.
- **Desenvolvimento** – o crescimento e o desenvolvimento das crianças é retardado. As epífises permanecem abertas. A secreção do hormônio de crescimento é deficiente, pois o hormônio tireoidiano é necessário para a síntese do hormônio de crescimento. O hipotireoidismo não tratado nas mulheres grávidas pode resultar em função intelectual reduzida na progênie.
- **Hematopoese** – a anemia pode ocorrer, geralmente do tipo normocítico. A anemia megaloblástica sugere anemia perniciosa coexistente.
- **Pele e cabelos** – a presença de uma pele seca e fria é comum. As glicosaminoglicanas acumulam-se na pele e nos tecidos subcutâneos, causando retenção de sódio e água. A face é inchada, e as feições, grosseiras. A pele tem um aspecto amarelado e pode ser descamada, e também alaranjada devido aos depósitos de caroteno. O cabelo não tem brilho. As sobrancelhas laterais afilam-se e o pêlo corporal é escasso.
- **Sistema nervoso** - os pacientes podem queixar-se de esquecimento, memória reduzida, alentecimento mental, depressão, parestesia, ataxia e redução da audição. As contraturas dos tendões mostram relaxamento alentecido.
- **Sistema cardiovascular** - pode haver bradicardia, débito cardíaco reduzido, bulhas cardíacas abafadas, miocárdio flácido, derrame pleural, baixa voltagem e ondas T achatadas no eletrocardiograma e edema nas posições dependentes, etc.
- **Sistema gastrointestinal** - a constipação é comum. Ocorre acloridria frequente associada à anemia perniciosa. O líquido ascítico, como os outros derrames serosos no mixedema, possui elevado conteúdo protéico.
- **Sistema renal** – uma redução na excreção de uma sobrecarga de água pode ser associada a hiponatremia. O fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular (GFR) estão reduzidos, mas a creatinina sérica é normal.

- **Sistema pulmonar** – as respostas ventilatórias à hipóxia e à hipercapnia estão reduzidas. O hipotireoidismo grave pode causar retenção de dióxido de carbono. Os derrames pleurais possuem um elevado conteúdo de proteínas.
- **Sistema musculoesquelético** – artralgia, derrames articulares, câibras musculares e músculos rígidos ocorrem. A creatinina-fosfoquinase sérica pode ser muito alta.
- **Sistema reprodutor** – a menorragia por ciclos ovulatórios pode ocorrer, ou a menstruação pode se tornar escassa ou mesmo cessar completamente em virtude da secreção deficiente de gonadotrofina. Em adolescentes pode haver amenorréia primária. A hiperprolactinemia ocorre por causa da ausência do efeito inibitório do hormônio tireoidiano sobre a secreção da prolactina e causa galactorréia e amenorréia.
- **Sistema metabólico** – hipotermia é comum. A intolerância à temperatura fria é um achado específico. A hiperlipidemia com aumento de colesterol e nos triglicerídeos séricos ocorre devido a redução no número de receptores da lipoproteína lipase; as condições hiperlipidêmicas hereditárias são exarcebadas pelo hipotireoidismo. O ganho de peso é comum apesar da redução na ingestão alimentar.

2.2.1 Hipotireoidismo congênito

O Hipotireoidismo Congênito (HC) é o distúrbio endócrino apontado como a causa mais comum de retardo mental passível de prevenção (ROSE, 2006). A incidência do HC é de quatro a cinco vezes maior do que a da fenilcetonúria, para a qual os programas de triagem foram originalmente desenvolvidos, sendo de aproximadamente, a níveis globais, 1/3000 a 1/4000 recém-nascidos vivos, em regiões em que o iodo é suficiente (PEZZUTI et al., 2009; DELADOËY et al., 2008; ABRAMOWICZ et al., 1992).

Entretanto, o aumento da sensibilidade na triagem dos recém nascidos e nos métodos de detecção do HC evidenciaram que a incidência varia conforme a localização geográfica. Os estudos demonstram que a incidência do HC também pode variar dependendo da etnias com alto grau de consaguinidade e em gêmeos ou indivíduos aparentados. A frequência é maior em neonatos brancos do que em

neonatos negros sendo a predominância feminina 2:1 entre mulheres e homens (RASTOGI & LAFRANCHI, 2010; ROSE, 2006; KNOBEL et al., 2001).

Um relatório com dados coletados no Quebec (Canadá) aponta que a preponderância do sexo feminino ocorre principalmente com tireóide ectópica, e em menor incidência em casos de agenesia, sendo esta prevalência relacionada a forma de HC por digenesia (DEVOS et al., 1999). Isto é corroborado por Perone et al., (2004).

Como supracitado, o HC é a principal causa de retardo mental evitável. Isso se deve ao fato de que os HTs são cruciais para o crescimento do sistema nervoso central (SNC) fetal durante os primeiros três anos de vida, sendo responsáveis por estimular a proliferação e migração de neuroblastos fetais, o crescimento axonal e dentrítico, a diferenciação dos oligodendrócitos e a mielinização. Se deficientes ou ausentes, suas funções serão prejudicadas, ocasionando graves consequências neurológicas, dentre as quais se destacam anormalidades: nas funções cognitivas, no tônus muscular, na marcha, na coordenação motora, na fala, na audição e na visão. Estes podem se manifestar isolados ou associados, estando diretamente relacionados ao tempo de determinação do diagnóstico: quanto mais cedo, menores são as sequelas no SNC (LAFRANCI, 2006).

2.2.2 Programa Nacional de Triagem Neonatal e o HC

O HC é considerado uma urgência pediátrica, podendo ocorrer consequências graves na ausência de tratamento (PEZZUTI et al., 2009). Por isso, o diagnóstico precoce e o tratamento iniciado nas primeiras semanas de vida são fundamentais para evitar retardo mental nas crianças afetadas (SETIAN, 2007). Neste contexto, o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) é fundamental por possibilitar a prevenção de sequelas indeléveis aos portadores da doença, quando diagnosticada e tratada tempestiva e corretamente (RAMALHO et al., 2004).

No Brasil, a triagem começou em 1976, na Associação dos Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) de São Paulo. Com o Estatuto da Criança e do Adolescente (ECA), em 1990, o exame tornou-se obrigatório em todo o país. Contudo, apenas eram triados os erros inatos do metabolismo. Em 2001, através da portaria nº 22, de 15/01/2001, foi criado o PNTN pelo Ministério da Saúde, objetivando diagnosticar

precocemente diferentes moléstias com tratamento possível e sequelas que podem ser prevenidas (MEDEIROS-NETO, 2008).

Conforme apontam os dados dos indicadores do PNTN, no Brasil são acompanhados 8.770 casos positivos para o HC, distribuídos nas cinco regiões brasileiras. Atualmente, este número possivelmente elevou-se, decorridos já quatro anos, pois, apenas no ano desta publicação foram detectados 1.231 casos para HC no país (estes dados foram incluídos). Conforme estes indicadores, o HC é a doença com maior número de casos, sendo as hemoglobinopatias a segunda doença mais incidente (5.903 casos) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Em Campina Grande, o programa de rastreamento para doenças congênitas, que atualmente é responsável por detectar Fenilcetonúria, Hipotireoidismo Congênito e Anemia Falciforme (fase II), foi regulamentado pela lei municipal 2.004 de 15/12/1989. Decorridas quase duas décadas de institucionalização, o programa ainda é muito deficiente pois conforme apontam dados de avaliação, o mesmo apresentou cobertura de apenas 32,2%, entre março de 2000 e fevereiro de 2001. De 2.192 coletas, apenas 54 foram realizadas adequadamente, o que corresponde a 2,5%. Além disso, os critérios recomendados pelo PNTN não estão sendo seguidos, no que se refere a idade média dos recém nascidos na primeira coleta e tempo de entrega dos resultados (RAMOS et al., 2003).

2.2.3 Classificação e etiologia do HC

A classificação vigente para o HC agrupa em cinco categorias: primário, secundário, sindrômico, periférico e transitório (RASTOGI & LAFRANCHI, 2010). A tabela 1 sintetiza esta classificação.

Tabela 1 - Classificação e etiologia do Hipotireoidismo Congênito**Hipotireoidismo primário**

Disgenesia da tireóide: hipotireoidismo, devido a uma anomalia do desenvolvimento (Ectopia da tireóide, agenesia, hipoplasia, hemiagenesia)

Mutações associadas: TTF1, TTF-2, PAX-8

Disormonogênese tireóide: o hipotireoidismo devido à produção hormonal deficiente

Mutações associadas: Defeito simportador sódio-iodeto (NIS)

Defeitos Peroxidase da tiróide (TPO)

Defeitos na produção do peróxido de hidrogênio (DUOX2, DUOX2)

Defeito na Pendrina (síndrome de Pendred)

Defeito na Tireoglobulina

Defeito na Deiododinase Iodotirosina (DEHAL1)

Resistência a sinalização ou ligação do TSH

Mutações associadas: defeito nos receptores do TSH

mutação na proteína-G: pseudohipoparatiroidismo tipo 1^a

Hipotireoidismo central (sin. hipotireoidismo secundário)

Deficiência isolada de TSH (mutação no gene na subunidade β doTSH)

Deficiência do hormônio liberador da tireotropina - TRH

Isolada, a síndrome de interrupção da haste hipofisária (EIPS), lesão do hipotálamo

Resistência ao hormônio liberador da tiotropina

Mutação no gene do receptor TRH

Mutação nos fatores de transcrição deficientes envolvidos no desenvolvimento da hipófise ou mutações nos genes HESX1, LHX3, LHX4, PIT1 PROP1

Hipotireoidismo Periférico

Resistência ao hormônio tireoideano

Mutação no receptor β da tireóide

Anormalidades no transporte do hormônio tireoideano

Síndrome Allan-Herndon-Dudley (mutação no transportador monocarboxilase 8)

Hipotireoidismo Síndrômico

Síndrome Pendred (surdez hipotireoidismo - bócio) *mutação na Pendrina*

Síndrome de Bamforth-Lázaro (hipotireoidismo - fenda palatina - cabelos espetados) *mutação no TTF-2*

Displasia ectodérmica (hipoidrótica - hipotireoidismo - discinesia ciliar)

Hipotireoidismo - (dismorfismo - polidactilia postaxial - déficit intelectual)

Síndrome Kocher-Deber-Semilange - (pseudohipertrofia muscular - hipotireoidismo)

Coréia Benigna - hipotireoidismo

Choreoathetosis - (hipotireoidismo - dificuldade respiratória neonatal) *mutação NKX2.1 / TTF-1*

Obesidade - colite - (hipotireoidismo - hipertrofia cardíaca - atraso no desenvolvimento)

Hipotireoidismo Congênito Transitório

Consumo materno de drogas antitireoidianas

Passagem transplacentária de anticorpos bloqueadores maternos ao receptor de TSH

Deficiência ou excesso de iodo maternal ou neonatal

Mutações heterozigotas de THOX₂ ou DUOX₂

Hemangioma hepático congênito / hemangioendotelioma

Adaptado de RASTOGI e LAFRANCHI, 2010.

Cerca de 85% do hipotireoidismo primário permanente é decorrente de defeitos na formação glandular durante a embriogênese e é denominada disgenesia tireoidiana - DT (RIVOLTA et al., 2005). A DT pode decorrer por agenesia glandular (25% a 35% dos casos), definida como ausência de tecido tireóideo detectável; ectopia (40% a 60%), com tecido tireóideo encontrado desde a base da língua até o mediastino ou hipoplasia (aproximadamente 5%), onde a glândula de tamanho reduzido se situa em posição cervical normal (KNOBEL et al., 2001).

Os defeitos em proteínas envolvidas síntese hormonal, geralmente hereditários, são classificados como disormonogênese e ocorrem em aproximadamente 15% dos casos (PERONE et al., 2004).

Qualquer que seja a etiologia, o tratamento para pacientes com HC se dá com reposição da tiroxina (T_4) sintética, mantendo os níveis séricos normais e permitindo o desenvolvimento psicomotor normal, evitando com isso o retardo mental.

2.3 Aspectos genéticos do HC

O avanço da biologia molecular permitiu a caracterização de diversas variações genéticas que interferem na hormonogênese tireoidiana por ocasionarem alterações deletérias nos genes que codificam as proteínas envolvidas organogênese da glândula e na síntese, armazenamento, secreção e utilização dos hormônios.

Os genes associados ao HC primário são agrupados em duas categorias: genes que causam a digenesia e genes que estão associados a defeitos na biossíntese do hormônios, ocasionando a disormonogênese.

2.3.1 Genes relacionados a digenesia

Estão inclusos genes que causam o HC não-sindrômico - defeito no receptor do TSH (rTSH) e os fatores de transcrição que causam o HC síndrômico: Fator de Transcrição 1 (TTF-1), Fator de Transcrição 2 (TTF-2) e *Pareid Box Transcription Factor 8* (PAX-8) (PARK e CHATTERJEE, 2005).

Evidências atuais sugerem que os fatores de transcrição TTF- 1 e TTF-2 e o PAX-8 são indispensáveis à evolução glandular devido às funções durante a

migração ou proliferação das células. Estes se expressam preferencialmente em tireócitos e interagem com promotores Tg, TPO, TSH e seu receptor rTSH e outros genes. Assim, mutações nos genes relacionados a DT podem causar a não formação do divertículo tireoidiano ou dificuldades na migração, o que faz a glândula se posicionar em local incorreto ou a redução no tamanho da mesma (KNOBEL et al., 2001).

Alterações moleculares no rTSH resultam em uma resposta comprometida ao TSH biologicamente ativo, o que se denomina de resistência ao TSH que poderá ser total ou parcial. As mutações causadoras do defeito comprometem os dois alelos, e o fenótipo caracteriza-se por concentrações circulantes elevadas de TSH e níveis normais ou baixos de HTs (RIVOLTA et al., 2005; RUBIO et al., 2002).

Os fatores transcricionais TTF-1 e TTF-2 atuam sobre os genes da Tg, do TPO e do rTSH. Mutações nesses fatores podem afetar a formação glandular (ocasionando a agenesia tireóidea) ou a migração das células primordiais (causando ectopia), além de outras alterações como a hipotonia muscular e problemas pulmonares (PARK e CHATTERJEE, 2005; RIVOLTA et al., 2005; KNOBEL et al., 2001).

O fator de transcrição PAX-8 é expresso no divertículo tireóideo, no cérebro e no rim e está envolvido na regulação dos passos iniciais do desenvolvimento de órgãos, definindo a especificação celular regional, através do controle que exerce sobre a expressão gênica dos genes da Tg e do TPO (PERONE et al., 2004).

2.3.2 Genes relacionados a disormonogênese

A disormonogênese se deve a defeitos em qualquer uma das proteínas intervenientes na síntese dos hormônios tireoidianos, na qual estão envolvidos os genes da Tireoglobulina (Tg), Hormônio Estimulante da Tireóide (TSH), receptor do Hormônio Estimulante da Tireóide (rTSH) e Tireoperoxidase (TPO). Também estão incluídos os genes que codificam as proteínas (Simportador Sódio Iodeto) NIS, (Pendrina) PDS e o (Sistema Gerador de H₂O₂) DUOX₂ (RASTOGI e LAFRANCHI, 2010).

A Tg é elemento chave na síntese hormonal, pois nela estão os resíduos de tirosina nos quais se ligam íons I⁻ no processo de síntese. Por isso, alterações nesta

proteína interfere na biossíntese, por ser considerada um pró-hormônio (RUBIO et al., 2002).

NIS é uma proteína integrante simporte localizada na membrana basal. A baixa captação do I⁻ pode está relacionada a defeitos nesta proteína o que interfere diretamente na hormonogênese (DAI et al., 1996).

A pendrina (PDS) é uma proteína apical transmembranosa que carrega o I⁻ para o colóide. Expressa-se predominantemente nas células foliculares tireóideas, no ouvido interno e rim. Mutações nesse gene impedem o transporte do iodeto para o local de síntese dos hormônios (lúmen do tireócito), resultando em HC por disormonogênese (KOPP, 2000).

O sistema DUOX₂ é responsável por gerar o peróxido de hidrogênio necessário a ação da TPO. Alterações neste sistema podem ocasionar defeito total na organificação do iodo (DE DEKEN et al., 2002).

Como apontados, defeitos em qualquer uma das proteínas participantes na via de biossíntese dos hormônios da tiróide podem está relacionados à origem do HC. Porém, o tipo mais comum de HC por disormonogênese se dá por defeitos no gene que codifica a proteína Tireoperoxidase, envolvida em mecanismos essenciais da hormonogênese (SIMM et al., 2009).

2.4 Enzima Tireoperoxidase – aspectos moleculares

O gene TPO humano é constituído por 17 éxons e 16 íntrons e contém aproximadamente 150 kb de DNA localizado no cromossomo 2p25. A estrutura nucleotídica do cDNA, localização cromossômica e sequência proteína foram mapeadas por KIMURA et al., (1987). O mRNA (*GeneBank Accession number*: NM_000547) compreende cerca de 3.1 Kb que codifica uma proteína de 933 aminoácidos de peso molecular de 103 kDa de DNA. É uma glicoproteína de membrana localizada na porção apical do tireócito com o centro catalítico voltado para o colóide, composto pelos éxons 8, 9, 10 (Figura 3) (PARK e CHATTERJEE, 2005; RIVOLTA et al., 2003).

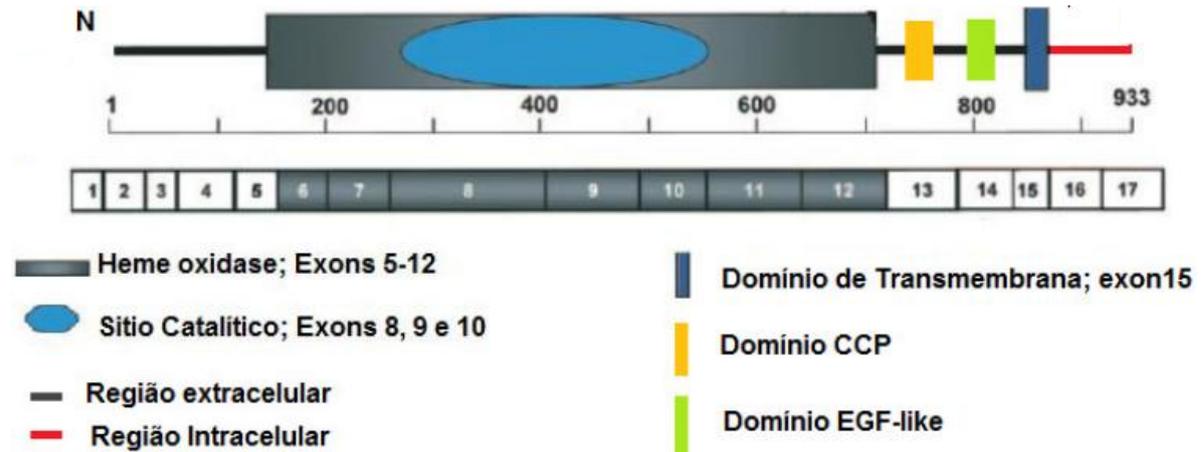


Figura 3 – Esquema representativo da estrutura do gene TPO. Adaptado de Neves, 2008.

Como supracitado, a TPO é apontada como a enzima chave na biossíntese dos hormônios, sendo responsável pela oxidação de íons iodeto (I^-), ligação do iodo às moléculas de tioreoglobulina e o mecanismo de *coupling* (TURKKAHRAMAN et al., 2010). Isto explica o fenótipo severo de portadores de mutações deletérias neste gene. O padrão de herança para o HC ocasionado por mutações no TPO é, na maioria dos casos, do tipo autossômico recessivo (RASTOGI & LAFRANCHI, 2010; KIMURA et al., 1987).

Entretanto, a literatura aponta casos em que mutação em apenas um alelo foi suficiente para alterações na estrutura e função da proteína, resultado no fenótipo severo com defeito total de organificação do iodeto (DTII) (NEVES et al., 2010; FUGAZZOLA et al., 2003). Geralmente, para este fenótipo ambos alelos são mutados, enquanto que para o HC do tipo leve, com defeito parcial de organificação do iodeto (DPII), apenas um alelo está alterado. Porém, este padrão pode ser modificado (STALPERS e BIKKER, 2010).

Foram descritas mutações homozigóticas ou heterozigóticas compostas e dados recentes apontam 61 mutações que se distribuem em todo o gene (Figura 4), o que demonstra a grande heterogeneidade nos defeitos para esta proteína. Desta maneira, dependendo da natureza da mutação, alteração em qualquer dos éxons poderá resultar em manifestações clínicas do HC (STALPERS e BIKKER, 2010; BAKKER et al., 2000).

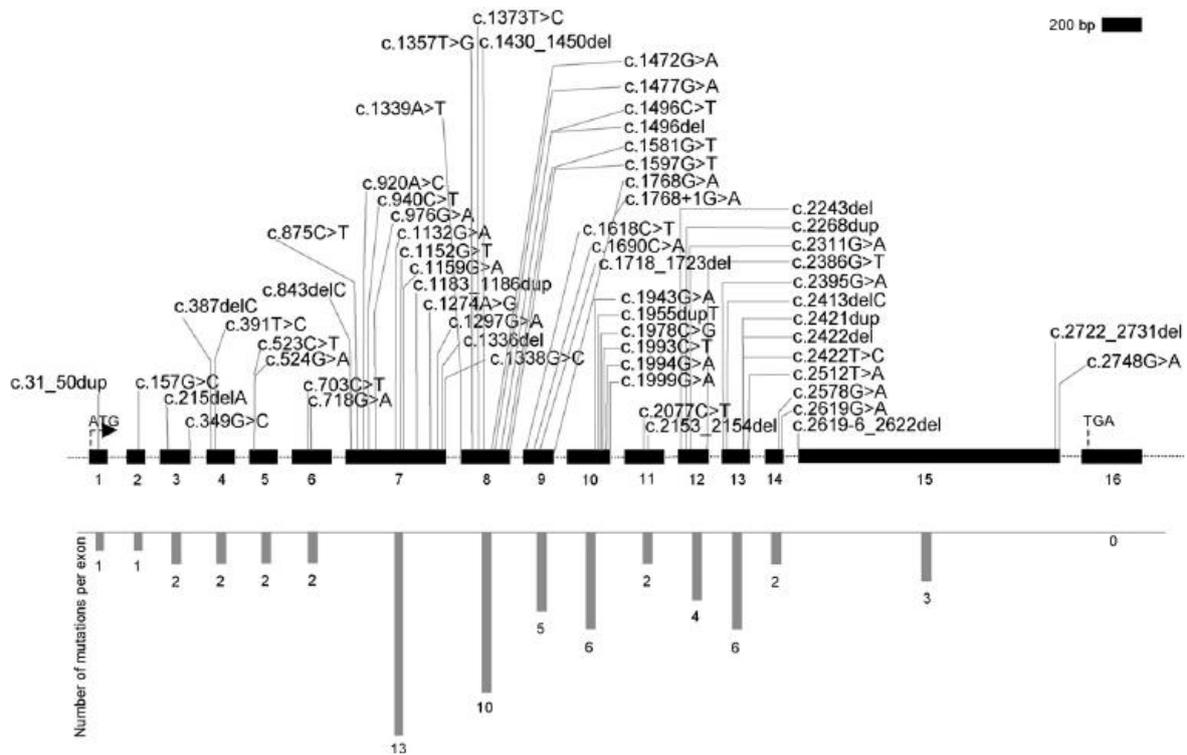


Figura 4 – Esquema do gene TPO com as mutações relatadas até o presente momento. Fonte: STALPERS e BIKKER, 2010.

Logo, o grande número de mutações identificadas corrobora com o fato de defeitos no TPO são a causa mais comum de HC por disormonogênese (DELADOËY et al., 2008). Nesse contexto, o rastreamento de mutações no gene TPO é fundamental para compreensão da natureza genética dos diferentes fenótipos que existem para o HC por disormonogênese.

2.5 Rastreamento de mutações

A identificação de mutações tem se tornado cada vez otimizada pela disponibilização de métodos que permitem a avaliação com precisão das alterações presentes nas doenças genéticas. A versatilidade, e em alguns casos, a simplicidade dessas metodologias vem permitindo uma importante maximização do conhecimento básico da estrutura e função gênicas (CARVALHO e RECCO-PIMENTEL, 2007).

Os estudos genéticos moleculares utilizam uma variedade de técnicas para analisar os ácidos nucleicos (DNA e RNA). Dentre elas destacam-se:

- ✓ técnicas de hibridização Southern e Northern *blots*, e hibridização *in situ* (HIS) - para identificação de sequências específicas;

- ✓ técnicas de amplificação de alvos-específicos como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), e suas variantes (PCR *Hot Start*, PCR *Touch-down*, PCR *Multiplex*, *Nested PCR* e *RT PCR*);
- ✓ tecnologia de microarranjos (*microarrays*) – possibilita a determinação de perfis de expressão gênica e identificação das sequências de gene;
- ✓ endonucleases de restrição e a técnica de Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição (*RFLP*) – permite a clivagem de sequências específicas;
- ✓ Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (*SSCP*) – possibilita a detecção de mutações através da mobilidade eletroforética dos fragmentos separados em um único filamento;
- ✓ Eletroforese em Gel Desnaturante (*DGGE*) – assim como *SSCP*, esta baseia-se nas diferenças de mobilidade eletroforética de fragmentos com seqüências de DNA;
- ✓ sequenciamento – determinação da sequência de nucleotídeos dos ácidos nucléicos ou a sequência de aminoácido das proteínas.

Os resultados destes ensaios podem ser úteis no diagnóstico, prognóstico, determinação da terapia a ser utilizada, e até mesmo na avaliação da suscetibilidade a doenças (RODRIGUES et al., 2006; KARP, 2005; BORGES-OSÓRIO e ROBINSON, 2001).

Entre os métodos citados, os que são mais utilizados para triagem de mutações são: o sequenciamento, o *SSCP*, o *DGGE* e o *RFLP*. Destes, o sequenciamento é apontado como método de maior nível de resolução, permitindo analisar cada uma das bases de determinada sequência de DNA (MOLINA & TOBO, 2004).

Entretanto, o sequenciamento requer altos investimentos em equipamentos e reagentes. Uma alternativa é o emprego de *SSCP*, que permite detectar mudança de uma única base em sequências de DNA amplificado por PCR (SHEFFIELD et al., 1993).

2.5.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

A técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foi descoberta em

1987 por Karry B. Mullis (1987). Consiste em uma reação de amplificação de regiões específicas de DNA flanqueada por um par de oligonucleotídeos sintéticos que funcionam como iniciadores da reação (*primers*), os quais se ligam a fitas complementares do DNA molde. A reação é catalisada por uma enzima termoestável – Taq DNA polimerase – para qual o cofator é o íon $MgCl_2$. É realizada em três etapas, que ocorrem em diferentes temperaturas, repetidas em ciclos: desnaturação do DNA, anelamento dos iniciadores à sequência específica e extensão da fita por ação da DNA polimerase (SAIKI et al., 1988).

A técnica é considerada um dos desenvolvimentos mais revolucionários da tecnologia do DNA recombinante, pois além de permitir amplificar fragmentos específicos, a PCR pode fornecer grandes quantidades de DNA a partir de amostras iniciais minúsculas. É a alternativa mais rápida e menos onerosa para clonagem e muitas outras aplicações da tecnologia do DNA. É largamente utilizada em testes para diagnóstico de doenças gênicas. Também é amplamente utilizada em investigação criminal e na medicina forense por permitir o trabalho com gotículas de sangue, a partir do qual o DNA é amplificado, obtendo-se uma impressão digital de DNA da pessoa investida – *fingerprinting* (KARP, 2005; BORGES-OSÓRIO e ROBINSON, 2001).

No processo de padronização da reação de PCR diferentes variáveis devem ser consideradas para obtenção de um protocolo reprodutível. A concentração dos componentes são fatores críticos, pois, o excesso ou a baixa concentração de um único componente interfere diretamente no sucesso da reação. Isto é refletido na inibição da reação, ocasionando a ausência de bandas, ou a formação de produtos inespecíficos. A temperatura de anelamento à sequência de DNA e o número de ciclos térmicos são variáveis que também devem ser observadas (VIEIRA, 2002).

O desenho dos iniciadores é fundamental para o sucesso da PCR, sendo ideal o par que se anele à uma única sequência alvo e não a outras regiões do DNA, na amostra. A complementariedade da sequência de bases presente na extremidade 3' deve ser total com o DNA-alvo para que o anelamento seja mantido de forma mais estável possível. Além disso, devem ser evitadas sequências complementares entre os dois iniciadores que formam o par de forma a minimizar a formação de dímeros (SAIKI et al., 1988).

Além da complementariedade, outro parâmetro importante dos iniciadores é a temperatura de anelamento (T_m), a qual depende do seu tamanho, do conteúdo

de GC e do tipo de cátion presente na solução. A temperatura ideal de anelamento é estimada em torno de 5°C abaixo da temperatura de fusão; entretanto, o estabelecimento de uma temperatura ótima depende de cada reação se fazendo necessário testes até a obtenção do melhor resultado. Assim, a especificidade de anelamento do iniciador com a sequência alvo depende de sua T_m e isso é um dos determinantes do sucesso da PCR (RODRIGUES et al., 2006).

Outro fator fundamental é a concentração do cofator da *Taq* DNA-polimerase - o magnésio (Mg^{+2}) - que é um cátion que se liga à enzima e é essencial a sua atividade. A *Taq* DNA-polimerase tem uma alta atividade na presença de 1,2 a 1,3 mM de Mg^{+2} livre; entretanto, essa concentração é afetada pela concentração dos dNTPs devido a seu efeito quelante com o Mg^{+2} , já que na reação o íon forma um complexo com estes blocos construtores, que interage com o esqueleto de açúcar-fostato dos ácidos. Assim, a alta concentração de dNTPs faz a concentração deste íon livre na reação diminuir, o que é crítico para reação (KRAMER e COEN, 2001).

Portanto, a concentração de Mg^{+2} tem uma influência significativa no resultado da PCR: se é muito baixa pouco produto amplificado é formado e se é muito alta há redução na fidelidade da da *Taq* DNA-polimerase, ocorrendo a formação de produtos inespecíficos (SHARMA et al., 1992). O efeito da concentração varia com diferentes pares de iniciadores e diferentes DNAs-moldes, de maneira que a concentração ótima deve ser determinada para cada reação. A concentração da enzima é outro fator limitante, pois quando em excesso há uma redução de sua fidelidade, ocorrendo a formação de produtos indesejados (RODRIGUES et al., 2006).

Outro parâmetro fundamental da PCR são as condições dos ciclos térmicos. A obtenção do produto amplificado e sua especificidade são também afetadas pelo tempo e número total de cada ciclo. Uma das razões para isso é que com a acumulação do produto da PCR (*amplicon*) a quantidade de iniciadores diminui, resultando no reanelamento das fitas sintetizadas umas às outras. Outro fator é que a *Taq* DNA-polimerase não é completamente termoestável o que faz com que algumas moléculas sejam inativadas a cada ciclo, devido a alta temperatura utilizada na desnaturação. As especificidades do termociclador e o tempo de incubação também interferem, pois, em geral, aqueles que alcançam rapidamente as temperaturas programadas contribuem para uma maior eficiência da reação (RODRIGUES et al., 2006; VIEIRA, 2002).

A PCR apresenta especificidades nas condições em que a reação acontece, sendo determinantes para um resultado satisfatório, pois cada reação possui suas próprias características quanto à concentração de reagentes e condições de temperatura.

Logo, é necessário para cada tipo de estudo a realização de testes nos quais se realize o ajustamento dos parâmetros e das condições da reação para a otimização dos resultados, obtendo-se a padronização de um protocolo satisfatório e que seja reproduzível. Durante a padronização, problemas com inibição da PCR, inespecificidade dos produtos obtidos, contaminação e impureza das amostras devem ser resolvidos, a partir dos sucessivos testes.

2.5.2 *Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)*

A técnica de SSCP foi desenvolvida em 1989 por Orita e colaboradores. Possibilita uma análise comprovadamente simples e efetiva para detecção de mutações de ponto em filamento simples de DNA. Dentre suas diferentes aplicações, é largamente utilizada para rastreamento de polimorfismos e marcadores genéticos (ORITA et al., 1989).

O princípio fundamental é a desnaturação do DNA dupla fita e a mobilidade eletroforética dos filamentos desnaturados. Quando aplicados no gel, estes filamentos tendem a se reanelar. Porém, se houver alguma mutação em uma das fitas ocorre a formação de heteroduplex, indicando alterações pontuais do fragmento devido a mudança conformacional da fita simples de DNA. Assim, a alteração de um único nucleotídeo é suficiente para alterar a mobilidade eletroforética sendo detectado por SSCP (KOZLOWSKI e KRZYZOSIAK, 2001; HAYASHI, 1991).

A migração diferenciada se deve ao dobramento alterado da sequência mutada que ocorre em função das interações intramoleculares. O direcionamento do fragmento durante a migração é um dos critérios utilizados para prever o tipo de alteração. Porém, não é possível determinar a nível molecular a especificidade da mutação (HAYASHI, 1991).

A sensibilidade da técnica é afetada por alguns fatores, dentre eles, o tamanho do fragmento de DNA. Para manter o alto desempenho do método em triagem de mutações, o ideal é que o tamanho dos fragmentos de PCR sejam entre

150-300 pb, pois para fragmentos maiores o desempenho da técnica poderá ser comprometido (KOZLOWSKI e KRZYZOSIAK, 2001).

Como a detecção de mutações através desta técnica depende de mudanças conformacionais da molécula de DNA em fita simples, a concentração, composição e temperatura do gel, bem como a concentração dos íons do tampão são fatores limitantes e que devem ser observados durante a padronização da técnica (SHEFFIELD et al., 1993).

A concentração do gel é um importante fator, pois quanto mais concentrado, maior é a malha formada pela bisacrilamida e menores são os poros por onde migrará a amostra, dificultando a migração. O efeito inverso ocorre com gel em menor concentração. No que se refere a temperatura, é aconselhável que a corrida eletroforética seja em torno de 4°C (HAYASHI, 1991).

Quanto a composição do gel, foi constatado que a presença do glicerol nas concentrações 5-10% otimiza consideravelmente a detecção de sequências mutadas, aumentando a sensibilidade para 99% em fragmentos de até 300pb e para 87% em fragmentos entre 300-450pb. Foi verificado que na ausência deste a sensibilidade é muito menor. Este fenômeno ocorre, provavelmente devido à ação de que o álcool exerce sobre os ácidos nucléicos, abrindo a estrutura quando está parcialmente dobrada de modo que a maior área de superfície da molécula fica exposta e, portanto, há mais oportunidade para as fibras de acrilamida confinar a diferença estrutural causada pela mutação (HAYASHI, 1991).

Como se evidencia, a combinação das técnicas PCR-SSCP resulta em um método simplificado, eficiente e de alta sensibilidade para detecção de mutações em DNA genômico.

3 METODOLOGIA

3.1 Local de estudo e amostragem

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular (BIOMOL) do Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) no estado da Paraíba.

O HC abordado no presente estudo foi do tipo permanente primário por disormonogênese, no qual foram excluídos os casos de digenesia.

Estudo tipo caso-controle em que foram analisadas 25 amostras de pacientes com hipotireoidismo congênito sintomáticos e/ou assintomáticos com diagnóstico clínico-laboratorial confirmado. O exame demonstrou a presença de glândula tóxica, com desenvolvimento e localização normais, tendo alguns deles maior volume da glândula (bócio). A presença deste aponta para o HC por disormonogênese, tipo de HC estudado nesta pesquisa. O grupo controle foi constituído por 22 indivíduos normais para o HC. Os dois grupos foram submetidos a exames clínicos nos quais foram verificados: peso, altura, idade, localização da tireóide e histórico familiar de ocorrência da doença.

A seleção da amostra ocorreu no hospital no qual o estudo foi desenvolvido, pelo serviço de endocrinologia responsável pelo atendimento de pacientes provenientes de diversos municípios do estado, principalmente, da 2ª macrorregião de Saúde. Todos os participantes assinaram um termo de consentimento autorizando a utilização das amostras para pesquisa científica e o projeto foi analisado e aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC/UFCG).

3.2 Coleta das amostras

O material coletado foi sangue periférico total através de punção venosa no volume de 10 ml, sendo 5 ml foi armazenado em tubo de coleta a vácuo com EDTA a 4°C do qual foi extraído o DNA genômico utilizado no estudo. O restante do sangue foi destinado a testes bioquímicos que foram realizados pelo método de quimioiluminescência utilizando-se como material o soro isolado para detecção T₄ livre, TSH, TG, anti TPO, anti TG.

3.3 Extração de DNA

A extração do DNA genômico das amostras de pacientes e controles foram realizadas com o emprego do *kit* de extração de *Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit 28-9042-64* (GE Healthcare), seguindo o protocolo indicado pelo mesmo. Conforme indicado nas especificações a quantidade de DNA obtido foi de 30-50 ng.

Também foi realizada extração orgânica seguindo o protocolo indicado por Sambrook e Russell (2001).

3.4 Padronização da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Na padronização da PCR (ORITA et al., 1989) para os éxons 1, 2, 3, 4, 5 e 8A, foram realizados utilizando o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores de DNA descrito por Rodrigues et al., (2005), conforme tabela 2. As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador gradiente Techgenee (FTGENE5D) programado para 10 min a 94° C para desnaturação inicial, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94° C (desnaturação), 1 min a 57° C (anelamento) e 1 min a 72° C (extensão), com extensão final de 72° C por 10 min.

Tabela 2 - Iniciadores utilizados na amplificação dos éxons 1, 2, 3, 4, 5, 8a do TPO.

Éxon	Tamanho do fragmento	Iniciador direto (5'→3')	Iniciador reverso (3'→5')	Temperatura de anelamento média (T _m)
1	460 pb	tct ccc tct tgt ata att ttt ccc c	cag ctt tgc tga tga gag acg c	64 °C
2	237 pb	tcc cat gg c ctt gtc agt	cag gag cta cca tta tgc cc	54 °C
3	222 pb	gaa ctg tca ttg cgc ttt ga	tct gca att gcg aaa atc ag	52 °C
4	361 pb	gtg cct gtc aca ttg tct gg	tgc aca aag tca agg tgt cc	56 °C
5	216 pb	tca tgg ttt cct att ttt cac a	cat gtt cag atc caa ctt tca c	55 °C
8a	263 pb	tga cct tga act ccc ctt tg	agc cgg agc agc cct tgc gc a	60 °C

Adaptado de RODRIGUES et al., (2005).

Nos testes foram modificadas as seguintes variáveis: temperatura de anelamento específica para cada éxon, concentrações da *Taq* DNA Polimerase e dos oligonucleotídeos iniciadores de DNA e a composição do tampão utilizado.

A composição dos tampões presentes no *kit*, estão indicadas na tabela 3. Também foi realizada PCR *Hot Start*, que é uma variante da técnica, utilizada para

diminuir a formação de produtos inespecíficos (RODRIGUES et al., 2006).

Tabela 3 – Composição dos tampões de calibração da reação de PCR do *kit* Phoneutria.

Tampão	Composição
Tampão IB (10X)	100mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 100mM KCl; 100mM Tris-HCL pH 8,4; 1% Triton X-100; 15mM MgCl ₂
Tampão IIIB (10X)	100mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 100mM KCl; 100mM Tris-HCL pH 8,4; 1% Triton X-100; 15mM MgCl ₂
Tampão IC (10X)	500mM KCL; 100mM Tris-HCL pH 8,4; 1% Triton X-100; 20mM MgCl ₂
Tampão IIC (10X)	400mM NaCl; 100mM Tris-HCL pH 8,4; 1% Triton X-100; 20mM MgCl ₂
Tampão ID (10X)	500mM KCL; 100mM Tris-HCL pH 8,4; 1% Triton X-100; 30mM MgCl ₂
Tampão IVB (5X)	Tampão especial para PCR (composição não informada pelo fornecedor)

Fonte: PHONEUTRIA BIOTECNOLOGIA & SERVIÇOS.

3.5 Eletroforese

O DNA isolado foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE (Tris-Ácido acético-EDTA: Tris-base 0.4 M, Ácido acético 0,2 M; EDTA 0,01 M, pH 8.3) corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta em transiluminador. Ao DNA da amostra foi adicionado 2 µl de tampão de amostra (TA) - (Tampão Tris 10mM, pH 7.5; EDTA 10mM; Azul de Bromofenol) e aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada juntamente com marcador de peso molecular 100pb (5 µg) (GE healthcare).

Os produtos das PCR's foram submetidos à eletroforese com gel de poliacrilamida à 7,5% com tampão TBE (Tris-Borato-EDTA: Tris Base, Ácido bórico, EDTA 0,5 M pH 8.0). Foi adicionado 5µl de TA (Tampão Tris 10mM, pH 7.5; EDTA 10mM; Azul de Bromofenol) a 5µl do produto da PCR e, em seguida, aplicada no gel, o qual foi submetido a uma tensão de 120 Volts com de amperagem variável durante 90 minutos e corado com Nitrato de Prata. O tamanho dos fragmentos amplificados foi caracterizado através de um marcador padrão de peso molecular 100pb (5 µg) (GE Healthcare).

3.6 Análise do gene TPO por SSCP

A padronização da técnica de SSCP (ORITA et al., 1989), utilizada para detecção das mutações e polimorfismos localizadas no gene TPO, foi realizada a 5% de glicerol (2ml), 10% de poliacrilamida (13,3ml), TBE 10X (Tris-Borato-EDTA) (20ml), 300ul de Persulfato de Amônio e 30ul de TEMED; o tampão utilizado para corrida das amostras foi o TBE.

Em 5ul da amostra de DNA amplificado (*amplicon*) foi adicionado 3ul de TA e 5ul de formamida. Em seguida, a amostra foi submetida a desnaturação a 95°C por 5 minutos, sendo imediatamente acondicionadas em gelo, para evitar que as fitas simples de DNA se reanelassem. Posteriormente, foram aplicadas no gel, previamente preparado, o qual foi corado pelo método de nitrato de prata. A corrida das amostras foi realizada a 50 Volts, em tempo total de 24 horas, dentro de refrigerador, o qual manteve a temperatura a aproximadamente 10°C.

Os padrões de migrações alterados (heteroduplexes), que podem caracterizar novas mutações, serão analisados posteriormente por sequenciamento direto.

3.7 Análise estatística

As frequências das mutações foram calculadas por contagem direta dos alelos. Foi realizada análise estatística através do teste *online* de pareamento T-student, disponível em <<http://studentsttest.com/>>.

4 RESULTADOS

4.1 Extração de DNA

A extração do DNA das amostras de sangue total de pacientes e controles foi efetuada de acordo com o protocolo do fornecedor do *kit* e pelo método de extração orgânica. O DNA isolado de 18 dos pacientes através do *kit* foi visualizado, conforme a figura 3.

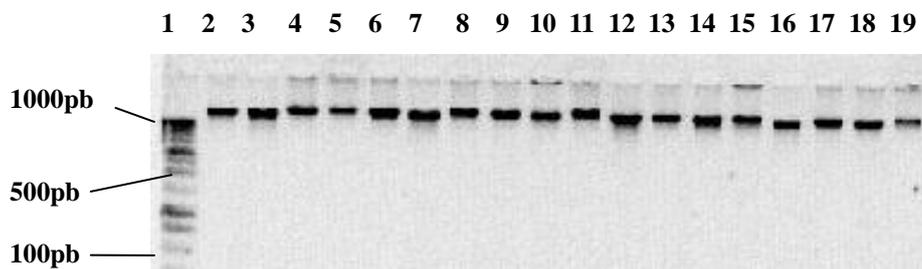


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose 1% com amostras da extração de DNA genômico de 18 pacientes. Canaleta 1: marcador molecular de 1kb. Canaletas 2-19: DNA dos pacientes 1 a 18.

O DNA extraído do grupo controle, de acordo o mesmo protocolo, foi visualizado em conforme a figura 4.

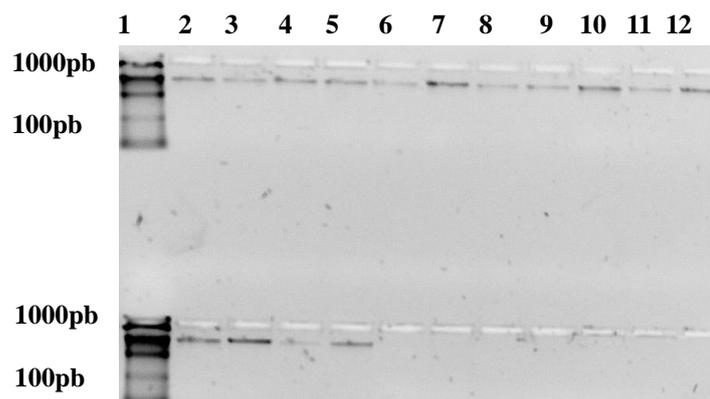


Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 1% com amostras da extração de DNA genômico de 15 controles. Região superior do gel - canaleta 1: marcador molecular de 100 pb; canaletas 2-12: DNA dos controles 1 a 11. Região inferior do gel - canaleta 1: marcador molecular de 100 pb; canaletas 2-5: controles 12 a 15. Fonte: foto da autora.

Amostras de DNA de controles isoladas através de extração orgânica, foram

em menor quantidade e portanto, aplicadas em diferentes géis para testar a extração, não estando acima apontados.

Apesar do protocolo e *kit* de extração utilizados terem sido os mesmos para o procedimento nas amostras dos pacientes e do grupo controle, a análise dos géis permite verificar diferença da intensidade da banda que corresponde ao DNA genômico, o que se explica por diferentes variáveis: o tamanho dos poços formados pelos pentes no gel 1 (figura 3) é menor que os poços formados no gel 2 (figura 4), fazendo com haja maior difusão do DNA aplicado no segundo gel; a quantidade de DNA aplicado no gel 1 foi de 3 µl e no gel 2 foi de 2µl – tampão de amostra no 1º gel foi 1µl e no 2º, 2µl ; as condições para realização do registro fotográfico do gel variaram, pois ocorrerem em diferentes ambientes – que pode ter influenciado pela maior ou menor luminosidade – e com diferentes câmeras fotográficas, alterando a imagem.

4.2 Padronização da reação de PCR

As condições da primeira reação realizada para os 6 éxons foram as seguintes: 2,5 µl de água mili-q, 0,2mM de DNTP's, 1X de tampão de reação (15mM MgCl₂; 500mM KCl; 100mM Tris-HCl pH 8,4; 1% Triton X-100)(Phoneutria), 50pmol iniciador direto, 50pmol de iniciador reverso, 2,5U/µl de *Taq* DNA Polimerase 1µl e 50ng de DNA. O volume final foi de 12,5µl. O programa utilizado no termociclador, descrito na metodologia supracitada, foi utilizado. Nestas condições não se obteve a presença das bandas esperadas para nenhum dos éxons.

As condições da reação para os seis éxons foram modificadas, obtendo-se a seguintes concentrações: 0,2mM de dNTP's, 1X de tampão de reação (Phoneutria), 1pmol de iniciador direto, 1pmol de iniciador reverso, 2,5U/µl de *Taq* DNA Polimerase e 50ng de DNA, totalizando no volume final 12,5µl, mantendo o mesmo programa de amplificação. Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida. O resultado obtido foi visualizado conforme figura 5.

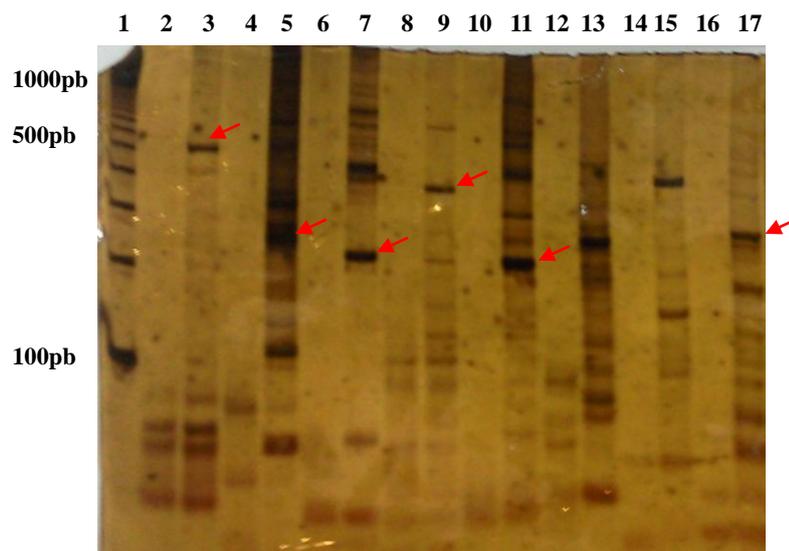


Figura 7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% com amostras da amplificação dos éxons 1, 2, 3, 4, 5 e 8A. Canaleta 1: marcador molecular de 100 pb; canaleta 2: (E1BR); canaleta 3: branco (E1C); canaleta 4: (E2BR); canaleta 5: (E2C); canaleta 6: (E3BR); canaleta 7: (E3C); canaleta 8: (E4BR); canaleta 9: (E4C); canaleta 10: (E5BR); canaleta 11: (E5C); canaleta 16: (E8ABR); canaleta 17: (E8AC).

As bandas com tamanhos esperados foram observadas em todos os éxons, de acordo com os tamanhos apontados na tabela 2, como também se visualizou excesso de bandas inespecíficas para todos os éxons.

Diante disto, a primeira variável a ser modificada durante a padronização foi o uso das temperaturas de anelamento (T_m) utilizando para cada éxon a média entre as T_m do iniciador direto e T_m do iniciador reverso. Se constatou a persistência na formação dos dímeros de iniciadores nos éxons 1, 2 e 3 indicando que os iniciadores ainda estavam em excesso. Nas reações dos éxons 4, 5 e 8a obteve-se eliminação dos produtos inespecíficos. Porém, para os éxons 4 e 8a, a intensidade da banda esteve bastante fraca, o que inviabilizou o uso destas condições.

A segunda variável a ser modificada foi a concentração de dois componentes da reação: *Taq* DNA polimerase e oligonucleotídeos iniciadores de DNA. O primeiro componente variou de 2,5U/ μ l para 1U/ μ l e o segundo componente de 1pmol para 0,8pmol. Nestas condições, as reações dos éxons 2 e 3 não funcionaram. A reação do éxon 1 foi melhorada significativamente, ficando livre de dímeros e bandas inespecíficas.

Foi realizada PCR *Hot Start*. Esta é uma variante da PCR tradicional, na qual a DNA-polimerase só entra em contato com os componentes da reação após a

primeira etapa da desnaturação. O programa de amplificação utilizado foi mantido. Para as reações dos éxons 2 e 5 os dímeros da reação foram eliminados e para as reações dos éxons 3 e 4 não houve melhora na reação.

A última variável testada foi a concentração dos íons de magnésio (Mg^{+2}) e a composição dos sais do tampão, através de um *kit* de calibração de PCR (Phoneutria), constituído por seis diferentes tampões, com suas variações descritas na tabela 3. Todos os éxons foram testados com cada tampão do *kit*. A tabela 4, aponta o tampão que otimizou ao máximo a reação para cada éxon.

Tabela 4 – Éxon e tampão específico.

Éxons	Tampão
1	IB
2	IC
3	IIIB
4	IB
5	IB
8a	IVB

Após estes testes, foi obtida a padronização da reação de todos os éxons, calculada para volume final 20ul, com as seguintes concentrações: 1X de tampão de reação (Phoneutria), 0,2mM de dNTP's, 0,8pmol de iniciador direto, 0,8pmol de iniciador reverso, 1U/ul *Taq* DNA Polimerase e 50ng de DNA. O programa do termociclador foi o mesmo para todos os éxons, com $T_m = 57^\circ C$ (conferir na metodologia).

4.3 Análise em SSCP

Os géis de SSCP foram realizados em conformidade com o protocolo descrito na metodologia. Foi realizada comparação entre os padrões eletroforéticos de migração das bandas dos heteroduplexs formados, observados na amostra de pacientes *versus* a amostra de controles. O perfil *standard* em todos os géis foi uma amostra negativa para o HC, o controle negativo (C -), nomeado como *perfil 1*. Logo, as amostras que apresentaram padrão eletroforético de migração semelhante ao C -, foi agrupada no perfil 1.

A partir da análise dos géis para o éxon 1, foi possível identificar três perfis de migração, conforme apontados na figuras 6 e 7.

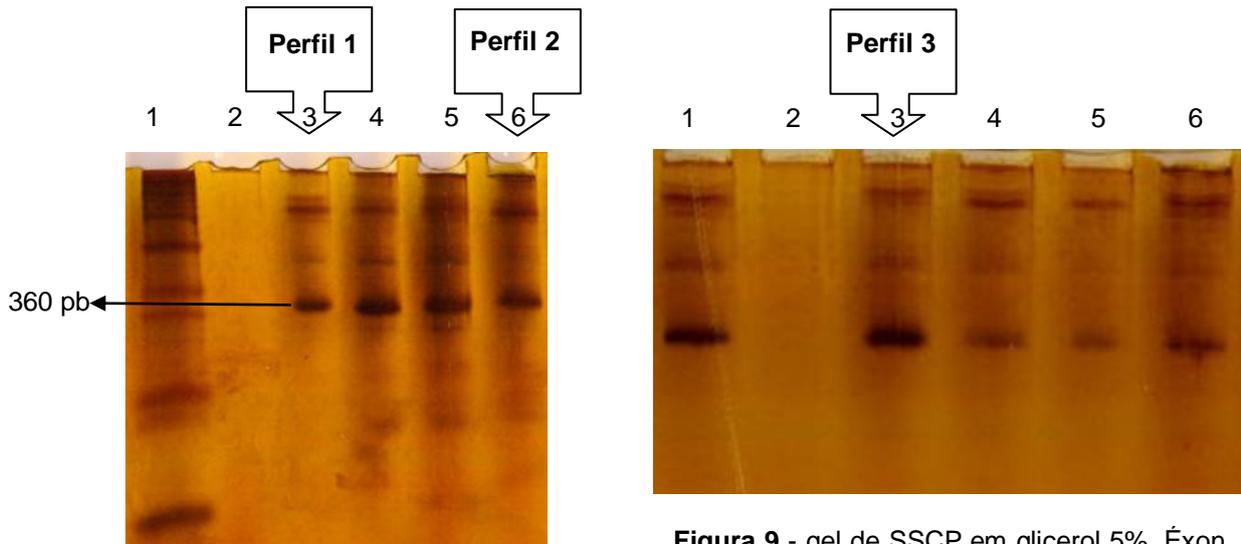


Figura 8 - gel de SSCP em glicerol 5%. Éxon 1 (Pacientes) - Canaleta 1: marcador 100pb; canaleta 2: branco da reação; canaleta 3: C - ; canaletas 4 - 6: P1 - P3.

Figura 9 - gel de SSCP em glicerol 5%. Éxon 1 - pacientes (complemento). Amostras de pacientes do éxon 1. Canaleta 1: C - ; canaleta 2: branco da reação; canelata 3-6: P21- P24.

A frequência observada na amostra de pacientes foi de 76% para o perfil 1, 16% para o perfil 2 e 8% para o perfil 3. Na amostra de controles observou-se que 95% dos indivíduos apresentaram o perfil 1 e 5% dos indivíduos apresentaram o perfil 2. Nenhum controle apresentou o perfil 3, o qual foi selecionado para posterior sequenciamento, por indicar provável mutação, assim como o perfil 2, por apontar possível polimorfismo (Gráfico 1).

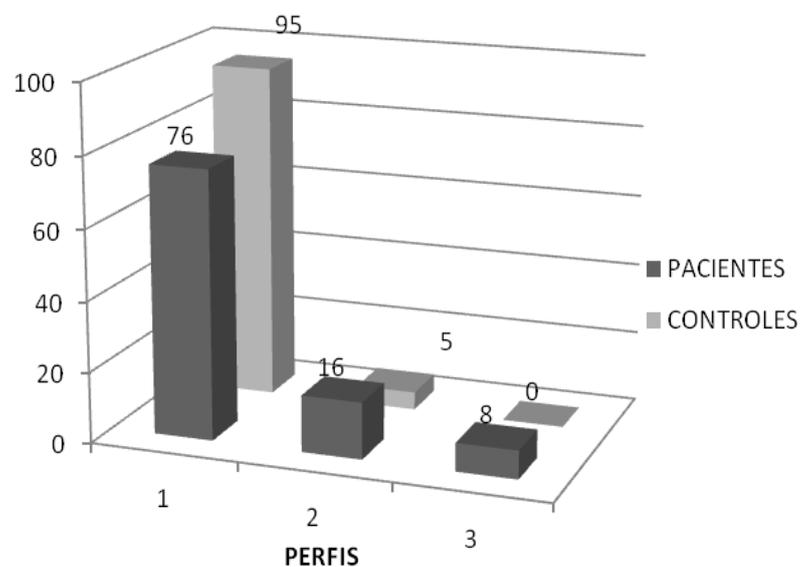


Gráfico 1 - Frequência dos perfis no éxon 1.

No éxon 2 foram observados dois padrões de migração, conforme a figura 8.

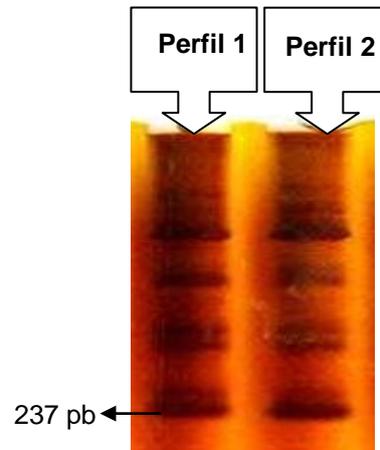


Figura 10 - gel de SSCP em glicerol 5%. Éxon 2 (Pacientes). Canaleta 1: P12; canaleta 2: P13

A partir dos cálculos das frequências dos perfis encontrados neste éxon, foi obtido o gráfico 2. Apenas na amostra de pacientes houve a presença do perfil 2: 96% apresentaram perfil 1 e 4% apresentaram perfil 2. Todos os controles apresentaram o perfil 1, correspondendo a 100%. Por este motivo, o perfil 2 foi selecionado para o sequenciamento, pois por sua baixa frequência indica provável mutação.

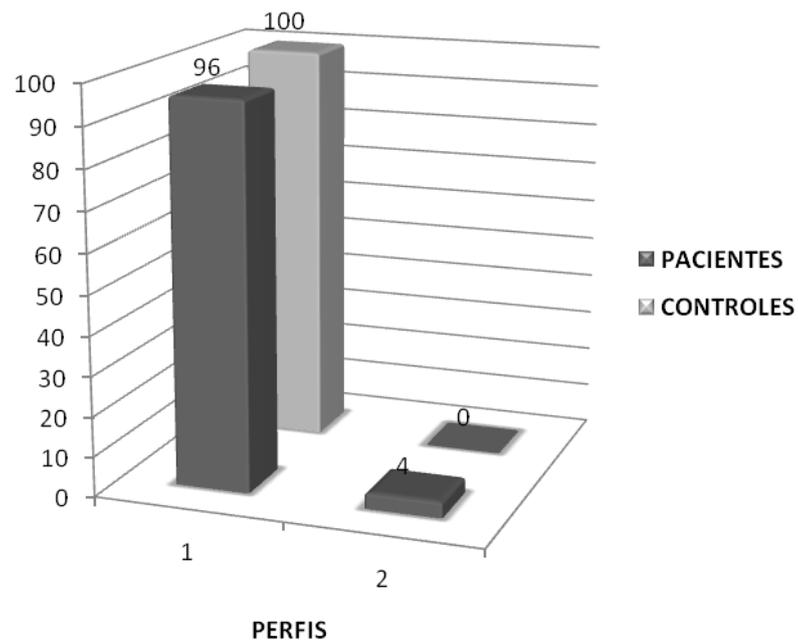


Gráfico 2 - Frequência dos perfis no éxon 2.

Para o éxon 3, três perfis foram verificados, apontados na figura 9.

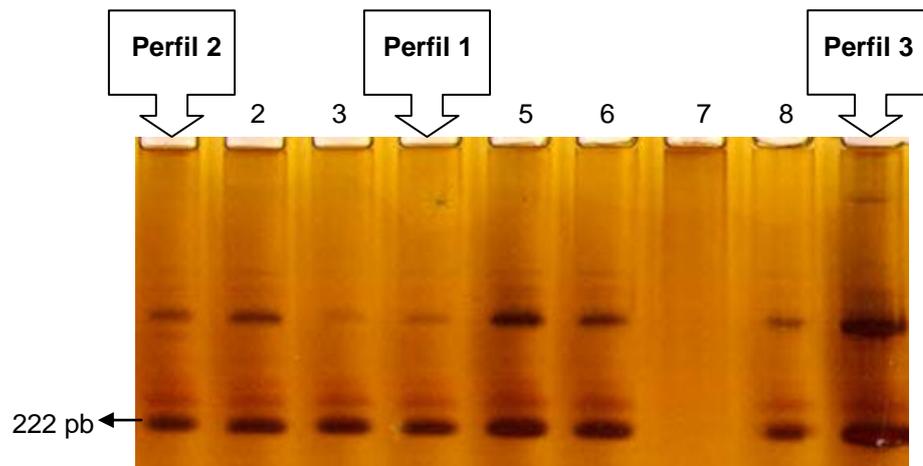


Figura 11 - gel de SSCP em glicerol 5%. Éxon 3 (Pacientes) - Canaleta 1-9: P5-P13.

Na amostra de pacientes para este éxon, observou-se que 76% apresentou o perfil 1, 12% apresentou o perfil 2 e 12% apresentou perfil 3. Na amostra de controles, 100% apresentou perfil 1, e portanto, nenhum controle apresentou os perfis 2 e 3 (Gráfico 3). Estes foram selecionados para sequenciamento para que sejam observadas as diferenças na sequência do éxon a nível molecular.

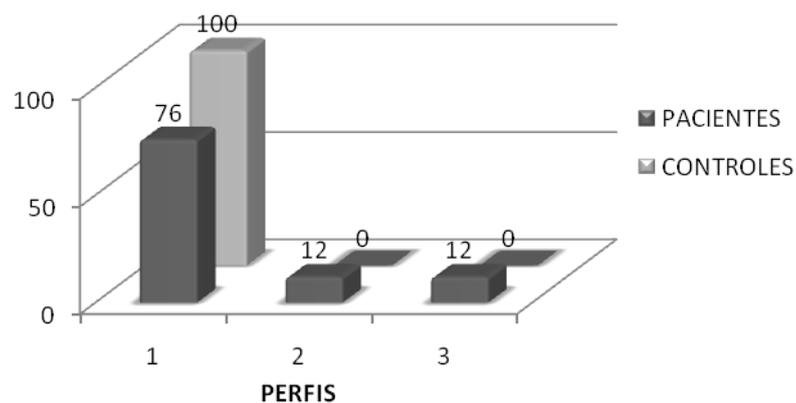


Gráfico 3 - Frequência dos perfis no éxon 3.

No éxon 4 foram observados dois perfis de migração, conforme se verifica na figura 10.

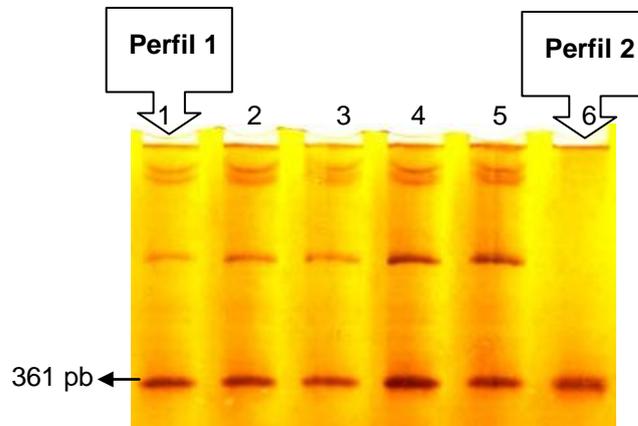


Figura 12 - gel de SSCP em glicerol 5%. Éxon 4 (Pacientes) - Canaleta 1:C -; canaleta 2-6: P21-P25.

Obteve-se, na amostra de pacientes, 96% apresentando o perfil 1 e 4% com padrão do perfil 2. 100% da amostra de controles apresentou perfil 1, sendo ausente o perfil 2, como se observa no gráfico 4. Neste éxon, o perfil 2 foi selecionado para sequenciamento, por apresentar baixa frequência na amostra e indicar provável mutação.

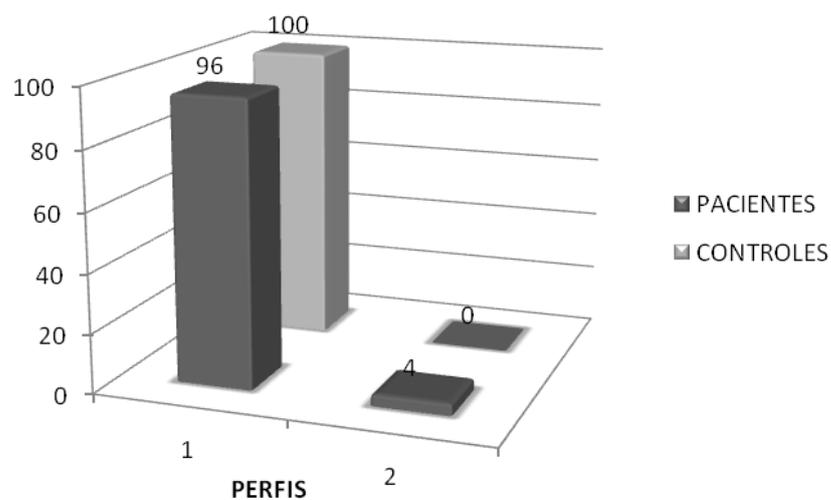


Gráfico 4 - Frequência dos perfis no éxon 4.

No éxon 5 foram verificados três padrões de migração, como observa-se na figura 11.

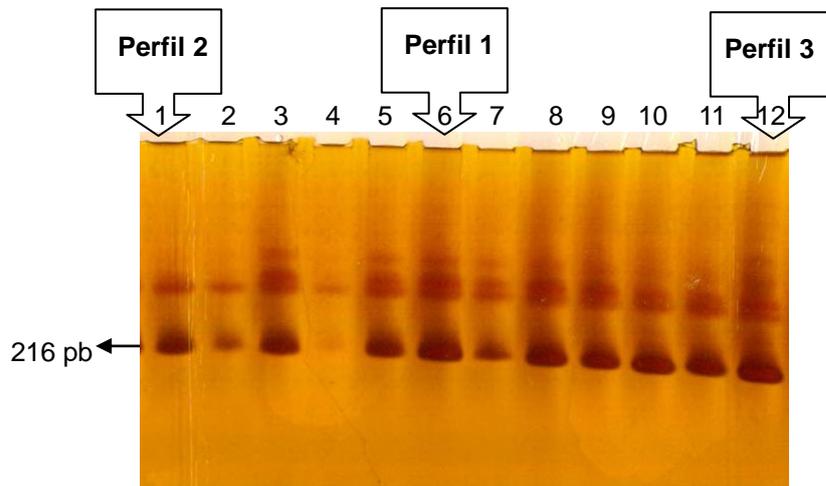


Figura 13 - gel de SSCP em glicerol 5%. Gel do éxon 5 (Pacientes) - Canaletas 5-12: P6-P17.

Como se evidencia no gráfico 5, 72% dos pacientes apresentaram o perfil 1, 24% o perfil 2 e 4% o perfil 3. Aproximadamente 73% dos controles apresentaram o perfil 1 e 27% o perfil 2. Nenhuma amostra de controle apresentou o perfil 3, sendo este perfil selecionado para sequenciamento. O perfil 2 também foi selecionado por indicar uma forma porlimórfica para o éxon.

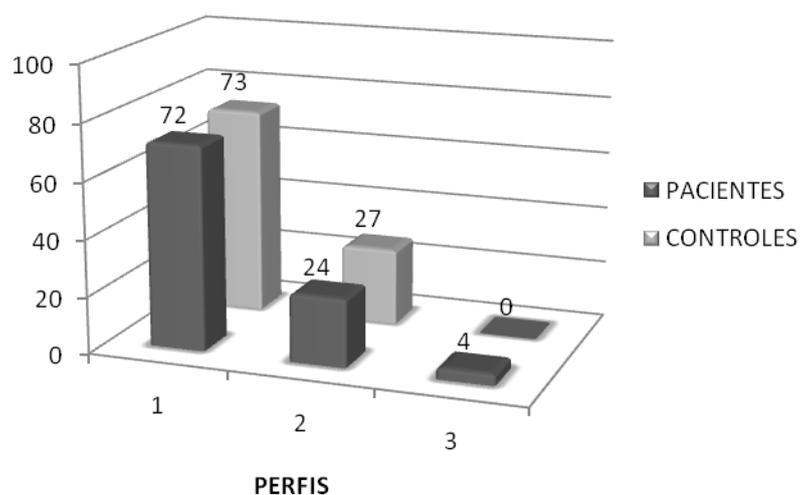


Gráfico 5 - Frequência dos perfis no éxon 5.

No éxon 8a foram observados quatro padrões de migração, apontados na figura 12.

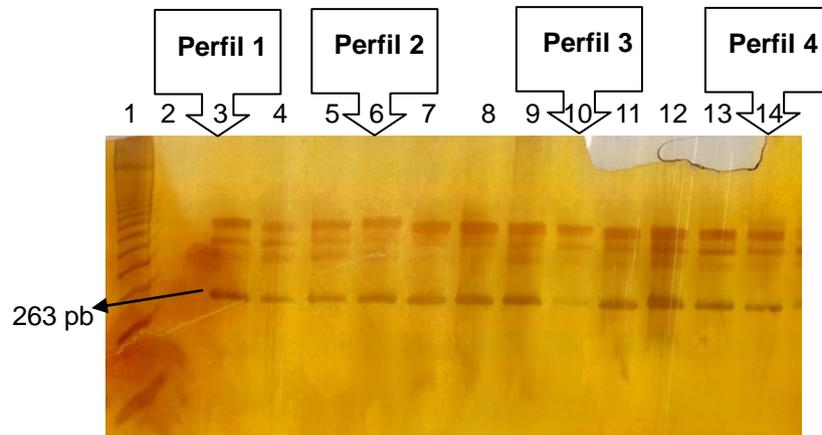


Figura 14 - gel de SSCP em glicerol 5%. Gel do éxon 8a (Pacientes) - Canaleta 1: marcador 100pb; canaleta 2: branco da reação; canaleta 3: C - ; canaletas 4 – 21: P1-P11.

A frequência dos perfis encontrados para este éxon estão evidenciados no gráfico 6. Na amostra de pacientes, 44% apresentaram perfil 1, 8% apresentaram perfil 2, 36% apresentaram perfil 3 e 12% apresentaram perfil 4. Na amostra de controles, 50% apresentaram perfil 1 e 50% apresentaram perfil 3. Não foram observados na amostra a ocorrência dos padrões 2 e 4, sendo estes selecionados para sequenciar por apresentarem indício de mutação.

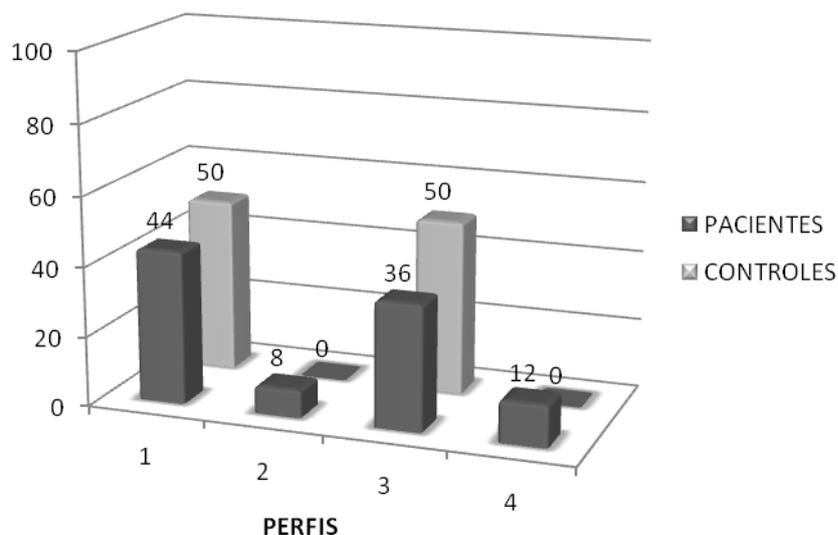


Gráfico 6 - Frequência dos perfis no éxon 8a.

A partir das análises realizadas dos padrões eletroforéticos de migração das amostras aplicadas em géis de SSCP, foi realizada a filtragem dos perfis que apresentaram baixa frequência, o que pode corresponder a possíveis mutações. A tabela 5 apresenta uma síntese do número de perfis encontrado em cada éxon, os perfis que indicam mutação e forma polimórfica para o éxon e os pacientes que apresentaram-nos, destacando, por diferentes realces os casos aparentados.

Éxon	Número total de perfis por éxon	Provável mutação no perfil indicado	Provável Polimorfismo no perfil indicado	Pacientes com padrões alterados por perfil
1	3	-----	2	P3, P10, P15, P16
		3	-----	P21, P24
2	2	2	-----	P13
3	3	2	-----	P4, P5 , P25
		3	-----	P13, P14 , P16
4	2	2	-----	P25
5	3	-----	2	P2, P3, P6, P7 , P9, P22
		3	-----	P17
8a	4	2	-----	P2, P3
		4	-----	P11, P17, P18

Tabela 5 – Número de perfis por éxon, perfis alterados e indivíduos portadores. **Casos aparentados:** Família 1 (P1, P4, P7); família 2 (P5, P12); família 3 (P6, P13, P14, P18).

Como se evidencia na tabela, os pacientes pertencentes à família 3 apresentaram o maior número de perfis alterados: éxons 2, 3 e 8a. Os pacientes da família 1, P4 e P7, apresentaram alteração nos padrões de migração dos éxon 3 e 5. O paciente 5 da família 2, também apresentou alteração no éxon 3.

Dentre os casos esporádicos, alguns, também apresentaram perfis diferentes do *standard* em vários éxons. O paciente 3 apresentou alteração nos éxons 1, 5 e

8a. Os padrões de migração do paciente 16 estiveram alterados nos éxons 1 e 3. No paciente 17 houveram alterações nos éxons 5 e 8a e no paciente 25, o perfis eletroforéticos estiveram alterados nos éxons 3 e 4.

Devido a sensibilidade do método em detectar mutações de ponto, as alterações aqui observadas podem ser resultado de substituições sinônimas (mutação *missense*), e substituições não sinônimas (*nonsense*). Também indicam deleção e duplicação de segmentos dos fragmentos analisados, podendo resultar em *frameshift*, alterando a sequência nucleotídica e conseqüente mudança na estrutura proteica, o que pode está relacionado ao fenótipo apresentado pelos pacientes.

Foi realizado teste T de pareamento entre a amostra de pacientes e a amostra e controles e as diferenças estatisticamente significantes foram observadas apenas para os éxons, 1 e 3 como se verifica: éxon 1 ($p = 0.00535$), éxon 2 ($p = 0.16364$), éxon 3 ($p = 0.00837$), éxon 4 ($p = 0.16364$), éxon 5 ($p = 0.37529$) e éxon 8a ($p = 0.30758$).

5 DISCUSSÃO

Durante os testes de padronização a maior dificuldade encontrada foi a amplificação de bandas inespecíficas. O excesso de componentes da reação - oligonucleotídeos iniciadores de DNA e Taq DNA polimerase - também foram verificados, tendo sido necessária sucessivas modificações nas condições da reação para obtenção da reação otimizada.

As temperaturas de anelamento (T_m) específicas para cada éxon foram utilizadas na tentativa de reduzir a formação dos produtos indesejados, pois, o sucesso da PCR depende principalmente da especificidade de anelamento dos iniciadores com a sequência alvo, e isso depende criticamente da sua temperatura média (T_m) (VIEIRA, 2002).

O excesso dos oligonucleotídeos iniciadores foi constatado pela formação de dímeros. Estes se formam quando há excesso de iniciadores na reação (VIEIRA, 2002).

A melhora das reações dos éxons citados por PCR *Hot start* é explicada pela especificidade que esta técnica confere na reação, já que a Taq DNA-polimerase só entra em contato com os componentes da reação após a primeira etapa da desnaturação, diluída no tampão *hot start*. O uso desta variante evita a formação de produtos indesejados devido ao anelamento inespecífico dos iniciadores e atividade da Taq DNA polimerase, favorecidos pela baixa temperatura (RODRIGUES et al., 2006). Portanto, a otimização da reação para os éxons supracitados é explicada pela especificidade que esta técnica confere na reação.

O teste para a concentração do íon cofator e dos sais do tampão, no qual se obteve a padronização da reação, permitiu a constatação de que as reações para os diferentes éxons ocorreram em melhores condições com tampões específicos. Isso se explica, pois, dependendo do tipo do sal há uma necessidade de maior ou menor concentração do cofator da enzima e que diferentes sais interagem de maneiras diferentes com as fitas de DNA gerando resultados que dependem exclusivamente da reação (KRAMER & COEN, 2001; SHARMA et al., 1992).

Padronizada a reação de PCR, através da técnica de SSCP, foram triados os padrões eletroforéticos alterados.

No éxon 1 verificamos que o perfil 2 apresentou alteração da posição do 3º heteroduplex, posicionado abaixo em relação ao mesmo heteroduplex do perfil 1.

Este padrão foi percebido nas amostras de pacientes e controles indicando um provável polimorfismo. O perfil 3, caracterizado por uma mudança da posição dos 3º e 4º heteroduplexes, localizados acima em relação ao perfil 1 foi observado apenas nos pacientes 21 e 23 (casos esporádicos). Esta alteração pode indicar inserção, duplicação ou mutação de ponto. Para este éxon já foram registrados polimorfismos heterozigóticos em amostra da população brasileira, com a troca G>A, na posição -35 e a troca A>G, na posição 16. Os pacientes apresentaram DPII associado a outros polimorfismos e mutações (NEVES, 2008).

O éxon 2 foi caracterizado pela presença do perfil 2 exclusiva no paciente 13 (família 3). Este perfil se distinguiu por apresentar mudança na localização do 9º heteroduplex, posicionado acima, o que pode indicar aumento no número de nucleotídeos no fragmento. Na população holandesa foi observada uma duplicação homozigótica neste éxon de 20 pares de base (pb) que gerou um mutação *frameshift* alterando a sequência de aminoácidos e gerando sinal de terminação no éxon 3. O fenótipo descrito se caracterizou por completa ausência da atividade da TPO (DTII). Neste caso não havia relação de consaguinidade e em três gerações não houve casos de HC (BIKKER et al., 1994).

Para o éxon 3 foram encontrados dois perfis alterados: 2 e 3. O perfil 2 foi observado nos pacientes 4 (família 1), 5 (família 2) e 25 (caso esporádico) e se distinguiu pela presença de uma banda antes 4º heteroduplex. O perfil 3, caracterizado pela presença de uma banda acima do 6º heteroduplex, foi verificado no pacientes 13 e 14 (família 3) e P16 (caso esporádico). Para ambos os perfis, a presença de uma banda a mais pode indicar inserção ou duplicação nucleotídica na sequência do fragmento. Na população chinesa, uma mutação heterozigótica do tipo *missense* para este éxon foi relatada, com substituição G>C (posição 157), ocasionando uma troca da alanina para prolina no códon 53 – (NIU, 2002).

No éxon 4, um padrão eletroforético diferente do perfil 1 foi constatado e exclusivo do paciente 25 (caso esporádico). Este perfil, se caracterizou por ausência de heteroduplexes, podendo indicar ausência de nucleotídeos por deleção de um segmento no fragmento. Foi encontrada na população argentina uma mutação *frameshift* resultante da deleção nucleotídeo adenina de posição 215 neste éxon, ocasionando troca do aminoácido 72, gerando um códon de parada prematuro no aminoácido 86 no mesmo éxon (RIVOLTA, 2007).

Dois perfis com padrão alterado foram distinguidos no éxon 5: perfis 2 e 3. O perfil 2 se caracterizou por ausência do 3º heteroduplex e foi identificado em pacientes e controles, indicando provável polimorfismo. O perfil 3 foi exclusivo do paciente 17 (caso esporádico), distinguido por apresentar uma banda acima do 3º em relação ao perfil 1. Para este éxon foi descrita mutação do tipo *missense* em população portuguesa, a substituição T>C (posição 391) que origina a troca de um resíduo de serina por uma prolina. Esta mutação elimina um potencial local de glicosilação da TPO, o N129. A perda deste local de glicosilação da proteína mutada possivelmente altera sua conformação e promove a sua degradação perturbando, com isso, transporte do I⁻ até membrana (RODRIGUES et al., 2004). Foi relatado que uma deleção do nucleotídeo citosina na posição 387 do éxon resultou em mutação *frameshift* no aminoácido 129 com um códon de parada prematuro putativo no aminoácido 208 no exon 7 (RIVOLTA et al., 2007).

O éxon 8a foi o éxon mais polimórfico na população aqui amostrada e três padrões eletroforéticos diferentes do perfil 1 foram observados. O perfil 2, presente nos pacientes 2 e 3 (casos esporádicos), se caracterizou por apresentar o 3º heteroduplexe posicionado acima relação à mesma banda do perfil 1. O perfil 3 apresentou alta frequência nas duas amostras e é indício de polimorfismo na população estudada. O perfil 4, observado nos pacientes 11 e 17 (casos esporádicos) e no P18 (família 3), foi caracterizado por apresentar bandas de baixa intensidade, acima do 3º heteroduplex. Este perfil, exclusivo da amostra de pacientes assim como o perfil 2 são indício de inserção e/ou duplicação de nucleotídeos.

Para o éxon 8 grande número de alterações deletérias já foram descritas, a exemplo da mutação *frameshift* homozigótica observada na população argentina, caracterizada uma duplicação tetranucleotídica - CCGG – 152pb acima da junção com o intron 8 na posição 1227 do éxon. A mutação gera códons de parada no éxon 9, resultando em uma proteína truncada e inativa (ABRAMOWICZ et al., 1992). Em estudo realizado com populações provenientes da Slovênia, Bósnia e Herzegovina, foi detectada duplicação – GGCC - na posição 1273_1276, em 32% dos pacientes avaliados, afetando a sequência da proteína (AVBELJ et al., 2007). Foi relatada uma deleção do nucleotídeo citosina, na posição 1425, e resulta em mutação *frameshift*, gerando um códon de parada no éxon 9 (BAKKER et al., 2000). Na Alemanha, Em um caso de HC familiar, com três indivíduos irmãos afetados, ambos heterozigotos

compostos, uma mutação *missense* foi encontrada com a troca G>C no nucleotídeo de número 1338 ocasionou a uma substituição de glutamina por histidina (SIMM et al., 2009). Em população portuguesa, uma mutação *missense* com a troca A>G no nucleotídeo de posição 1274 resultou na mudança da asparagina por serina no códon 425, criando um novo sítio de restrição para enzima *DdeI* (RODRIGUES et al., 2005).

Como existem, na amostra estudada, pacientes aparentados e afetados para o HC é possível que existam mutações relacionadas a este fator. A presença de padrões alterados em diferentes éxons, tanto nos casos familiares quanto nos casos esporádicos, sugerem a ocorrência de mutações em diferentes locais do gene. A confirmação por sequenciamento e o estudo de cossegregação, permitirá a determinação da origem da herança dos alelos mutados e a correlação entre o fenótipo destes pacientes e a natureza das mutações. Em estudo realizado com casos de HC familiar em população chinesa, foi demonstrado que uma mutação presente em cinco diferentes famílias estava associada ao efeito fundador (NIU et al., 2002). Em amostra de população norte americana, constatou-se que em quatro das cinco famílias estudadas, os indivíduos afetados com HC provinham de casamentos consanguíneos, sendo os pais primos em primeiro grau (MANGKLABRUKS et al., 1991).

O efeito fundador e a consaguinidade são fenômenos que podem estar relacionados às prováveis mutações expressadas nas famílias aqui amostradas, uma vez que as mesmas são provenientes de pequenas cidades do interior das adjacências de Campina Grande (2ª macrorregião de saúde). Agrega-se o fato da tradição de casamentos consanguíneos ser predominante na região Nordeste (SANTOS & BIZZO, 2005). Em comunidades isoladas, colonizadas por um núcleo pequeno de indivíduos, há uma tendência à casamentos consanguíneos e como o fluxo gênico é restrito há maior chance de aparecimento de genótipos raros por recessividade refletindo em mutações genéticas, encontrando-se mutuamente dois fatores que favorecem o aparecimento de alelos deletérios (BITTLES & BLACK, 2010).

Como supracitado, o HC por disormonogênese para mutações no TPO é herdado por transmissão autossômica recessiva. Assim, a ocorrência dos casos esporádicos aqui presentes poderão ser explicados após o sequenciamento por duas maneiras: expressão monoalélica e heterozigose composta. Na primeira o

indivíduo afetado recebe dois alelos de progenitores não aparentados, sendo que um dos alelos está mutado, e este é o que se expressa, resultando em DTII, fenótipo típico de herança autossômica recessiva. Casos como esses são relatados por Neves et al., (2010) e por Fugazzola et al., (2003).

Outra forma de explicar o fenótipo esporádico para HC é por heterozigose composta, quando os progenitores não aparentados carregam mutações diferentes em cada um dos alelos. Ao ocorrer a recombinação, os alelos se encontram possibilitando a ocorrência do genótipo heterozigoto composto, resultando em um indivíduo afetado. Foi relatado que mutações tanto em indivíduos homozigotos quanto heterozigotos compostos eram responsáveis por inativação na atividade enzimática da TPO, demonstrando não haver diferença na penetrância nem expressividade variável (BAKKER et al., 2000). Este fenômeno também explicou o caso de pseudominância para herança do HC por disormonogênese em população canadense, como descrevem Deladoëy et al., (2008).

Por ser o perfil genômico brasileiro resultado da miscigenação de povos de diferentes origens étnicas, como apontam Carvalho-Silva et al. (2001) e Alves-Silva et al. (2000), as mutações descritas para as diferentes populações poderão ser aqui encontradas, além da possibilidade da ocorrência de mutações novas. Isso é corroborado com um estudo molecular no gene TPO realizado com amostra da população paulistana, no qual diferentes mutações novas e polimorfismos foram encontrados além da constatação de mutações já descritas para outras populações (NEVES et al., 2008). Neste estudo, também foi encontrado um caso de expressão monoalélica, pouco relatado na literatura (NEVES et al., 2010).

Os éxons 1, 2, 3, 4, e 5 aqui analisados, codificam aminoácidos de uma porção da proteína TPO correspondente a região extracelular. Há baixa incidência de mutação para estes éxons em relação àqueles que codificam o centro catalítico da enzima, entre os quais se incluem o éxon 8 (RIVOLTA et al., 2003; BAKKER et al., 2000). Entretanto, os resultados das mutações, descritas ao longo de todo o gene, apontam para a perda da atividade enzimática o que indica que os resíduos alterados estão localizados em regiões cruciais da proteína (STALPERS e BIKKER, 2010). A alteração nos diferentes éxons pode ocasionar um arranjo estrutural defeituoso impedindo-a realizar suas funções na hormonogênese (RODRIGUES, 2004).

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que:

- A padronização e a tipagem por SSCP foram eficientes para identificações de padrões alterados de migração para os exons analisados;
- Os padrões eletroforéticos alterados são indícios de mutações tanto nos casos familiares quanto em casos esporádicos;
- as mutações para população amostrada estão distribuídas em todo o gene, tanto nos éxons que codificam o centro catalítico, como na porções extracelular;
- as mutações presentes no gene TPO da amostra em análise estão relacionadas ao HC manifesto, entretanto, a relação genótipo-fenótipo ainda não foi realizada.

7 PERSPECTIVAS

Caso seja confirmado que as relações familiares é fator da origem genética do HC nas famílias amostradas, deverá ser instituído um programa de aconselhamento genético que convoque as famílias para que sejam orientadas sobre os riscos que advém das relações entre indivíduos de mesmo *pool* gênico.

Nos casos de HC em que não sejam confirmadas mutações no gene TPO, deverá ser dada a sequência ao estudo seguindo algoritmo de busca dos genes candidatos, pois como supracitado, outros genes também estão relacionados ao HC por disormonogênese.

Para elaboração do método de diagnóstico molecular, uma alternativa é o estudo com ênfase nas enzimas de restrição utilizadas na técnica de *RFLP*, pois diversos sítios de mutação são relatados na literatura para este gene.

Portanto, deverá ser dada a continuação deste trabalho, pois, como se constata, existem muitas questões a serem elucidadas no que se refere a hererogeneidade do HC e as causas relacionadas. Logo, futuros trabalhos no estado devem surgir para rastrear mutações nos genes relacionados à doença.

REFERÊNCIAS

- AVBELJ, Magdalena. et al. High prevalence of thyroid peroxidase gene mutations in patients with thyroid dysmorphogenesis. **European Journal of Endocrinology**. v. 156, n. 5, p. 511–519, may. 2007.
- ABRAMOWICZ, Marc J. et al. Identification of a Mutation in the Coding Sequence of the Human Thyroid Peroxidase Gene Causing Congenital Goiter. **Journal of Clinical Investigation**. v. 90, n. 4. p. 1200-1204, oct. 1992.
- ALVES-SILVA, Juliana. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. **American Journal of Human Genetics**. v. 67, n. 2, p. 444–461, may. 2000.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação- referências - elaboração. Rio de Janeiro, 2002.
- BAKKER, Bert; et al. Two decades of screening for congenital hypothyroidism in the Netherlands: TPO gene mutations in total iodide organification defects (an Update). **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 85, n. 10, p. 3708-3712, oct. 2000.
- BIKKER, Hennie. et al. A 20-basepair duplication in the human thyroid peroxidase gene results in a total iodide organification defect and congenital hypothyroidism. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 79, n. 1, p. 248-252, jul. 1994.
- BITTLES, A. H.; BLACK, M. L. Consanguinity, human evolution, and complex diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 107, n. 1, p. 1779–1786, jan. 2010.
- BORGES-OSÓRIO, Regina; ROBINSON, Wanyce Mirian. Desvendando o genoma humano: métodos de estudo, terapia e implicações éticas – Projeto Genoma Humano. **Genética Humana**. 2. ed. Porto Alegre: ArtMedcap. cap.17, 2001.
- CARVALHO-SILVA, Denise R. et al. The Phylogeography of Brazilian Y- chromosome Lineages. **American Journal of Human Genetics**. v. 68, n. 1, p.281–286, jan. 2001.
- CARVALHO, Hernandes F. RECCO-PIMENTEL, Shirlei M. **A Célula**. 2. ed. Barueri, SP: Monole, p. 57-66, 2007

DAI, Ge ; LEVY, Orlie ; CARRASCO, Nancy. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. **Nature**. v. 379, n. 6564, p. 458-460, feb. 1996.

DE DEKEN, Xavier. et al. Characterization of ThOX Proteins as Components of the Thyroid H₂O₂-Generating System. **Experimental Cell Research**. v. 273, n. 2, p. 187-196, feb. 2002.

DELADOËY, Johnny; et al. Pseudodominant Inheritance of Goitrous Congenital Hypothyroidism Caused by *TPO* Mutations: Molecular and *in Silico* Studies. **Jornal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 93, n. 2, p. 627–633, feb. 2008.

DEVOS, Heidi. et al. A Search for the Possible Molecular Mechanisms of Thyroid Dysgenesis: Sex Ratios and Associated Malformations. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 84, n. 7, p. 2502-2506, jul. 1999.

DOHÁN, O; CARRASCO, N. Advances in Na(+)/I(-) symporter (nis) research in the thyroid and beyond. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 213, n.1, p. 59-70, dec. 2003.

DOUGLAS, Carlos Roberto. **Tratado de Fisiologia** – aplicada às Ciências Médicas. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1043-1059, 2006.

FUGAZZOLA L, N. et al. Monoallelic Expression of Mutant Thyroid Peroxidase Allele Causing Total Iodide Organification Defect. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 88, n. 7, p. 3264–3271, jul. 2003.

GNIDEHOU, SÉDAMI. et al. Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site. **Jornal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. v. 18, n. 13, p. 1574-1576, oct. 2002.

GUYTON, Arthur C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 731-738, 1992.

HAYASHI, Kenshi. PCR-SSCP: A Simple and Sensitive Method for Detection of Mutations in the Genomic DNA. **Genome Research**. v. 1, n. 1, p. 34-38, aug. 1991.

HERSHMAN, Jerone M. Hipotireidismo e Hipertireoidismo. *In*: LAVIN, Norman.

Manual de Endocrinologia no adulto e na criança. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, cap. 28, 2006.

KARP, Gerald. **Biologia Celular e Molecular.** 3.ed. Barueri, SP: Monole, p. 765-783, 2005.

KIMURA, Shiok. et al. Human thyroid peroxidase: Complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping, and identification of two alternately spliced mRNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v. 84, n. 16, p. 5555-5559, aug. 1987.

_____. et al. Structure of the Human Thyroid Peroxidase Gene: Comparison and Relationship to the Human Myeloperoxidase Gene. **Biochemistry.** v. 28, n. 10, p. 4481-4489, may. 1989.

KNOBEL, Meyer; MEDEIROS-NETO, Geraldo. Hipotireoidismo. *In*: WAJCHENBERG, Bernardo Leo. (Org.). **Tratado de Endocrinologia Clínica.** 1. ed. São Paulo: Roca, p. 308-327, 1992.

KNOBEL, Meyer; NOGUEIRA, Célia Regina; MEDEIROS Neto, Geraldo. Genética Molecular do Hipotireoidismo Congênito. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia.** v. 45, n. 1, p. 24-31, fev. 2001.

KOPP, Peter. Pendred's Syndrome and Genetic Defects in Thyroid Hormone Synthesis. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders.** v. 1, n. 1, p. 109-121, jan. 2000.

KOTANI, T. et al. Partial iodide organification defect caused by a novel mutation of the thyroid peroxidase gene in three siblings. **Clinical Endocrinology.** v.59, n. 2, p. 198-206, aug. 2003.

KOZLOWSKI, Piotr; KRZYZOSIAK, Wlodzimierz J. Combined SSCP/duplex analysis by capillary electrophoresis for more efficient mutation detection. **Nucleic Acids Research.** v. 29, n. 14, p. 1-14, jul. 2001.

KRAMER, Martha F. ; COEN, Donald M. Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization. **Current Protocols in Molecular Biology.** 2001.

<http://media.wiley.com/CurrentProtocols/047150338X/047150338X-sampleUnit.pdf> >. Acesso em: 3 jun. 2011.

LAFRANCI, Stephen. Distúrbios tireoidianos nos recém-nascidos e seu rastreamento. *In*: LAVIN, Norman. **Manual de Endocrinologia no adulto e na criança**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, cap. 30, 2006.

MANGKLABRUKS, Ampica. et al. Genetic Linkage Studies of Thyroid Peroxidase (TPO) Gene in Families with TPO Deficiency. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 72, n. 2, p. 471-476, feb. 1991.

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

MEDEIROS-NETO, GERALDO. Hipotireoidismo congênito no Brasil: desafios à busca e soluções. *In*: MEDEIROS-NETO, GERALDO; KNOBEL, MEYER (Org.). **Hipotireoidismo congênito no Brasil: desafios à busca de soluções**. São Paulo: Conectfarma Publicações Científicas, p. 5-9, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Indicadores do Programa Nacional De Triagem Neonatal**. Brasília, 2007. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/INDICADORES_TRIAGEM_NEONATAL.pdf >. Acesso em: 2 jun. 2011.

MOLINA, A. L.; TOBO, P. R. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Einstein**. v. 2, n. 2, p. 139-141, 2004. Disponível em: < <http://www.einstein.br/biblioteca/artigos/Vol2Num2/Serie%20Biologia%20parte%202.pdf> >. Acesso: 3 jun. 2011.

MULLIS, L.B; FALLONA, FA. Specific Synthesis of DNA in vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. **Methods Enzymol**. v. 155, p. 335-350, 1987.

NEVES, Solange Caires. **Hipotireoidismo congênito: rastreamento e identificação de mutações no gene TPO em pacientes com defeito parcial ou total de incorporação do iodeto**. 131 f. Dissertação [Mestrado em Ciências com concentração em endocrinologia] – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2008.

NEVES, Solange caíres. et al. Monoallelic Thyroid Peroxidase Gene Mutation In A Patient with Congenital Hypothyroidism with total Iodide Organification Defect.

Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo. v. 54, n. 8, p. 732-737, nov. 2010.

NIU, DAU-MING. et al. High Prevalence of a Novel Mutation (2268 insT) of the Thyroid Peroxidase Gene in Taiwanese Patients with Total Iodide Organification Defect, and Evidence for a Founder Effect. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.** v. 89, n. 7, p. 4802-4212, sep. 2002.

ORITA, MASATO. et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v. 86, n. 8, p. 2766-2770, apr. 1989.

ORITA M, Suzuki Y, Sekiya TE, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomic.** v. 5, n. 4, p. 874-879, nov.1989.

PARK, S M; CHATTERJEE, V K K. Genetics of congenital hypothyroidism. **Jornal of Medical Genetics.** v. 42, n. 5, p. 379–389, may. 2005.

PERONE, Denise; et al. Aspectos Genéticos do Hipotireoidismo Congênito. **Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia.** v. 48, n. 1, p. 62-69, fev. 2004.

PEZZUTI, ISABELA L; LIMA, Patrícia P.; DIAS, Vera M. A. Congenital hypothyroidism: the clinical profile of affected newborns identified by the Newborn Screening Program of the State of Minas Gerais, Brazil. **Jornal de Pediatria,** Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p. 72-79, jan/feb. 2009.

RAMALHO, Roberto José R. et al. Evolução do Programa de Triagem Neonatal Para o Hipotireoidismo Congênito e Fenilcetonúria no Estado de Sergipe de 1995 a 2003. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia,** São Paulo, v. 48, n. 6, p. 890-896, dez. 2004.

RAMOS, Alberto José S. *et al.* Avaliação do Programa de Rastreamento de Doenças Congênitas em Campina Grande – PB, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia,** São Paulo, v. 47, n. 3, p. 280-284, jun. 2003.

RASTOGI, Maynika V; LAFRANCHI, Stephen H. Congenital hypothyroidism. **Orphanet Journal of Rare Diseases.** v. 5, n. 17, p. 1-22, jun. 2010.

RIVOLTA, Carina M. et al. Five Novel Inactivating Mutations in the Thyroid Peroxidase Gene Responsible for Congenital Goiter and Iodide Organification Defect. **Human Mutation**. v. 22, n. 3, p. 1-5, sep. 2003.

_____. et al. La tiroides como modelo de mecanismos moleculares en enfermedades geneticas. **Medicina** (Buenos Aires). v. 65, n. 3, p. 257-267, may/jun. 2005.

_____. et al. Two compound heterozygous mutations (c.215delA/c.2422TC and c.387delC/c.1159G) in the thyroid peroxidase gene responsible for congenital goitre and iodide organification defect. **Clinical Endocrinology**. v. 67, n. 2, p. 238–246, jun. 2007.

RODRIGUES, Carina de Fátima. **Rastreo molecular do gene da peroxidase da tireóide em doentes com hipotireoidismo congênito**. 2004. 105f. Dissertação [Mestrado em Genética Molecular] - Universidade do Minho. Escola de Ciências. Departamento de Biologia, 2004.

RODRIGUES, Carina de Fátima; et al. Mutation screening of the thyroid peroxidase gene in a cohort of 55 Portuguese patients with congenital hypothyroidism. **European Journal of Endocrinology**. v. 152, n. 2, p. 193–198, feb. 2005.

RODRIGUES, Jaqueline Josi Samá; SILVA, Rosângela de Castro; SIQUEIRA, Marilda Mendonça. Técnicas de Biologia Molecular Aplicadas ao Diagnóstico. *In*: ROSETTI, Maria Lucia; SILVA, Cláudia Maria Dornelles da; RODRIGUES, Jaqueline Josi Samá [Orgs.]. **Doenças infecciosas - Diagnóstico Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 1, 2006.

ROSE, Susan R. Update of Newborn Screening and Therapy for Congenital Hypothyroidism. **Pediatrics**. v. 117, n. 6, p. 2290-2303, jun. 2006.

RUBIO, Ileana G. Sanches. et al. Hipotireoidismo Congênito: Recentes Avanços em Genética Molecular. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**. v. 46, n. 4, p.391-401, ago. 2002.

SAIKI, Randall K. et al. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science**. v. 239, n. 4839, p. 487-491, jan. 1988.

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

SANTOS, SILVANA;BIZZO, NELIO. From New Genetics to Everyday Knowledge: Ideas about how genetic diseases are transmitted in two large Brazilian families. **Science Education**. v. 89, n. 4, p. 564-576, jul. 2005.

SETIAN N. Hypothyroidism in children: diagnosis and treatment. **Jornal da Pediatria**. Rio de Janeiro, v. 83, n. 5, p. 209-2116, nov. 2007.

SHARMA, J.K.; GOPALKRISHNA, V.; DAS, B.C. A simple method for elimination of unspecificB amplifications in polymerase chain reaction. **Nucleic Acids Research**. v. 20, n. 22, p. 6117-6118, nov. 1992.

SHEFFIELD, V. C.The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection pf single base substitutions. **Genomics**. v. 2, n.16, p. 325-332, may. 1993.

SIMM, Diemud. et al. Two novel mutations in the human thyroid peroxidase (TPO) gene: genetics and clinical findings in four children. **Acta Pædiatrica**, v. 98, n. 6, p. 1057–1061, jun. 2009.

SINGER, Peter A. Avaliação da função tireoidiana. In: LAVIN, Norman. **Manual de Endocrinologia no adulto e na criança**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006. cap. 28.

STALPERS, Carrie Ris; BIKKER, Hennie. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to TPO mutations. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 322, n. 1, p. 38–43, jun. 2010.

TAUROG A. Hormone synthesis: thyroid iodine metabolism. In: **Werner and Ingbar's The Thyroid**. 8/4:52-85. Eds LE Braverman & RD Utiger, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

TURKKAHRAMAN, Doga. et al. Analysis of TPO gene in Turkish children with iodide organification defect: identification of a novel mutation. **Endocrine**. v. 37, n. 1, p. 124–128, nov. 2010.

VAISMAN, Mário; ROSENTHAL, Doris; CARVALHO, Denise P. Enzimas Envolvidas na Organificação Tireoideana do Iodo. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**. v. 48, n. 1, p. 9-15, fev. 2004.

VIEIRA, Daniel Perez. **Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações**. 2002. Disponível em: < <http://www.imt.usp.br/portal/images/stories/Proto/aula1.pdf> >. Acesso em: 03 jun. 2011.