



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

CAMILA MARQUES QUEIROZ

**BUSCA DE MUTAÇÕES NOS ÉXONS 06, 07, 8B, 09, 10 e 12 DO GENE
TIREOPEROXIDASE (TPO) EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO
CONGÊNITO**

**Campina Grande – PB
2011**

CAMILA MARQUES QUEIROZ

**BUSCA DE MUTAÇÕES NOS ÉXONS 06, 07, 8B, 09, 10 e 12 DO GENE
TIREOPEROXIDASE (TPO) EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO
CONGÊNITO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, cumprindo-se às exigências para a obtenção do grau de licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Dr^a Simone Silva dos Santos Lopes

Campina Grande – PB

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

Q3b

Queiroz, Camila Marques.

Busca de mutações nos éxons 06, 07, 8b, 09, 10 e 12 do gene tireoperoxidase (TPO) em pacientes com hipotireoidismo congênito [manuscrito] / Camila Marques Queiroz. – 2011.

44 f.: il.

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

CAMILA MARQUES QUEIROZ

**BUSCA DE MUTAÇÕES NOS ÉXONS 06, 07, 8B, 09, 10 e 12 DO GENE
TIREOPEROXIDASE (TPO) EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO
CONGÊNITO**

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

MONOGRAFIA APROVADA EM: 10/06/2011.
NOTA 9,5 (nove vírgula cinco).

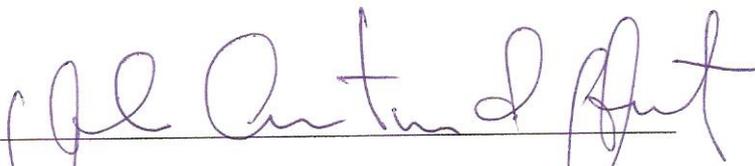
BANCA EXAMINADORA



Prof^ª. Dra. Simone Silva dos Santos Lopes - UEPB



Prof. Dr. Mathias Weller - UEPB



Prof^ª. Dra. Silvana Cristina dos Santos - UEPB

Campina Grande, 10 de junho de 2011

AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de agradecer primeiramente a Deus. Que toda honra e glória seja dada a Ti, Senhor. Obrigada pelas oportunidades concedidas, pela capacitação que me destes e que tantas vezes achei não ser capaz. Obrigada por ter ouvido minhas preces e tornado realidade mais um sonho. Aqui estou, perseverarei, tomei a direção certa em meio de tantas dúvidas e obstáculos. Senhor, muito obrigada por tudo! És a minha Fortaleza.

Agradeço a pessoa mais importante da minha vida, minha mãe. Mãe, obrigada por esse amor incondicional, por esse amor que não se mede. Pelos valores que me ensinastes, pelos esforços que fizestes para que eu aqui estivesse, por me proporcionar tudo que tenho e sou. Agradeço todos os dias a Deus pela mãe que Ele me presenteou, és a presença humana Dele em minha vida. És o estímulo que me impulsiona a buscar uma vida melhor a cada dia. A vitória, por mais uma etapa vencida, também é sua. Te amo muito!

Ao meu pai, que com seu exemplo de vida mostrou que os estudos é o crescimento de cada um de nós. Que com os estudos chegamos longe. Que tudo podemos perder mas o conhecimento é a única dádiva que nunca nos será tirado. Rogo à Deus que sempre me ajude a alegrar teu coração. Prometo me esforçar ao máximo para chegar até onde você chegou. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Agradeço aos meus avós, minhas pérolas raras, minha base. Obrigada por tanto amor, carinho, atenção, conselhos e lição de vida. Estarão sempre em meu coração.

À minha família, tias, primos (as) e agregados, obrigada pela confiança.

Em especial agradeço a professora Dra. Simone Silva dos Santos Lopes, pela oportunidade, paciência e confiança ao decorrer da pesquisa. Obrigada por ter me mostrado o fantástico mundo da genética. Foi a responsável por minha iniciativa na área. Só tenho que agradecer por ter me acolhido. Muito obrigada!

Ao meu querido Iranilson, muito obrigada pela força, compreensão, ajuda e carinho que me dedicastes. Deus também te usou como ponte para que eu chegasse no tão almejado estágio em genética. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos e me proporcionar momentos inesquecíveis. Te amo muito!

Aos meus adoráveis amigos de estudo, os meus dias se tornaram muito mais gratificante com a contagiante alegria de vocês.

Às minhas queridas amigas de laboratório, Rayane, Alana Rayssa, Larissa, Raissa, Rubistenia, Cláudia e Liliana. Obrigada pela ajuda e conversas descontraídas.

A equipe do BIOMOL pelo acolhimento e confiança.

A Embrapa Algodão, que teve fundamental participação na minha iniciação científica desde o início. Agradeço em especial a Dra. Liziane Maria de Lima pela oportunidade, confiança no estágio e pelo conhecimento prático concedido na área de Biologia Molecular. À Antonio e Vandrê que sempre me ajudaram nas infinitas PCRs, no manuseio do termociclador, nas extrações de DNA, no tempo da fonte que eu não podia esperar por conta da aula. Obrigada por vocês sempre terem me ajudado e respondido as minhas inúmeras perguntas sobre genética e suas praticidades. À Morgana pelas conversas engraçadas e motivação. Lizi, Antonio, Vandrê e Morgana, às vezes não entendemos as oportunidades que Deus coloca em nossa vida uma vez que vamos ter que apenas 'passar' por elas, as amizades construídas, as risadas, as preocupações com a PCR que não amplificava entre outros, mas hoje entendo com clareza e gratidão a importância que todos vocês tiveram em minha caminhada. Foi com vocês que aprendi o que hoje eu sei de laboratório e molecular. E desde já fiquem sabendo que me sai muito bem onde cheguei, graças a vocês. Obrigada a todos que participaram dessa importante etapa da minha vida. Agradeço de coração por tudo! Nunca esquecerei!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

À Universidade Estadual da Paraíba, em especial aos professores que participam e incentivam a construção do conhecimento, disponibilizando tamanha experiência e, percebendo e atentando para temas que não faziam parte, em profundidade, de nossas vidas. Obrigada!

Obrigada a todos que de forma direta ou indireta tiveram sua contribuição somada a esse trabalho. Os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O hipotireoidismo congênito (HC) é o mais comum distúrbio endócrino congênito com prevalência de 1/3000-4000 recém-nascidos. Por definição, um indivíduo acometido por HC resulta da falta de efeitos dos hormônios tireoideano (HT) sobre os tecidos corporais. O diagnóstico precoce e preciso da doença é de fundamental importância para a intervenção terapêutica atempada e retardo mental evitável. Dos casos de HC a disgenesia corresponde a 85% dos casos enquanto que a disormonogênese 10-15%, sendo a principal causa, mutações no gene da Tireoperoxidase (TPO), enzima chave na síntese do HT. No intuito de identificar variantes polimórficas mais frequentes em pacientes com HC no estado da Paraíba, este estudo teve como objetivo identificar através da técnica Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP) as prováveis mutações nos éxons 06, 07, 8B, 09, 10 e 12 do gene TPO. Nos resultados obtidos observamos que os éxons 06 e 07 não apresentaram padrão polimórfico, enquanto que os éxons 8B, 09, 10 e 12 apresentaram perfis variáveis e com possíveis mutações. Dessa forma podemos concluir que o SSCP provou ser um método eficaz para a triagem de mutações no gene TPO; nos éxons 09, 10 e 12 indivíduos pertencentes às mesmas famílias compartilharam o mesmo padrão eletroforético, o que corrobora que esses perfis alterados correspondam a mutações no gene TPO; verificamos maior número de perfis variáveis, prováveis mutações associadas ao HC nos éxons 8B, 09, 10 que correspondem ao centro catalítico na enzima; e com o sequenciamento dos perfis alterados rastreados por SSCP poderemos caracterizar a natureza das mutações, como também identificar polimorfismos e mutações relacionadas com HC, e dessa forma verificar a frequência dessas mutações na população paraibana.

Palavras chaves: Hipotireoidismo Congênito, gene TPO, Análise de Mutações, SSCP.

ABSTRACT

Congenital hypothyroidism (CH) is the most common congenital endocrine disorder with a prevalence of 1/3000-4000 newborns. An individual with CH results in the lack of thyroid hormones (TH) on body tissues. The early and accurate diagnosis of the disease is critical for therapeutic intervention and mental retardation preventable. Cases of HC dysgenesis accounts for 85% of cases while dysmorphogenesis 10-15%, being the main cause gene mutations Thyroperoxidase (TPO) which is the key enzyme in the synthesis of TH. In order to characterize the most frequent mutations in patients with HC in the state of Paraíba, this study aimed to identify through the technique of Conformation Polymorphism, Single-Stranded (SSCP) the probable mutations in exons 06, 07, 8B, 09, 10 and 12 of the TPO gene. According to the results found that the exons 06 and 07 showed no polymorphic pattern, while the exons 8B, 09, 10 and 12 showed variable profiles and possible mutations. Thus we can conclude that the SSCP proved to be an effective method for screening for mutations in the TPO gene, in exons 09, 10 and 12 individuals belonging to these families shared the same electrophoretic pattern, which confirms that these profiles correspond to mutations in the altered TPO gene, we found more variable profiles, HC likely associated mutations in exons 8B, 09, 10 corresponding to the catalytic center in the enzyme, and the sequencing of the altered profiles screened by SSCP can characterize the nature of the mutations, as well as identify polymorphisms and mutations related to HC, and thus determine the frequency of mutations in the population of Paraíba.

Keywords: Congenital Hypothyroidism, TPO gene, Analysis of mutations, SSCP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Glândula Tireóide.....	13
Figura 2 – Epitélio folicular da tireóide.....	14
Figura 3 – Síntese dos hormônios tireoideanos.....	16
Figura 4 – Gel de Poliacrilamida 10% (desnaturante - 5% de Glicerol) Análise dos pacientes para o éxon 06.....	30
Figura 5 – Gel de Poliacrilamida 10% (desnaturante - 5% de Glicerol); Análise dos pacientes para o éxon 07.....	30
Figura 6 – Gel de Poliacrilamida 10% (desnaturante - 5% de Glicerol); Análise dos controles para o éxon 07.....	31
Figura 7 – Gel de Poliacrilamida (desnaturante - 5% de Glicerol); Análise dos pacientes para o éxon 8B.....	32
Figura 8 – Gel de Poliacrilamida (desnaturante - 5% de Glicerol); Análise dos pacientes para o éxon 8B.....	33
Figura 9 – Gel de Poliacrilamida (desnaturante - 5% de Glicerol); Análise dos pacientes para o éxon 09.....	34
Figura 10 – Gel de Poliacrilamida (desnaturante - 5% de Glicerol); Análise dos pacientes para o éxon 10.....	35
Figura 11 – Gel de Poliacrilamida (desnaturante - 5% de Glicerol); Análise dos pacientes para o éxon 12.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Éxon 07: Representação da frequência do perfil 1 em pacientes e 2 em controles.....	31
Gráfico 2 – Éxon 8B: Representação da frequência dos perfis 1 ao 4 entre pacientes e controles.....	33
Gráfico 3 – Éxon 09: Representação da frequência dos perfis 1 ao 7 em pacientes e controles.....	34
Gráfico 4 – Éxon 10: Representação da frequência dos perfis 1 ao 4 em pacientes e controles.....	35
Gráfico 5 – Éxon 12: Representação da frequência dos perfis 1 ao 7 em pacientes e controles.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação dos éxons em estudo.....	28
Tabela 2 – Possíveis mutações encontradas entre 25 doentes com HC no rastreio molecular do gene ta TPO.....	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1. A Glândula Tireóide	13
2.1.1. Hormônios Tireoideanos: síntese e secreção	14
2.1.2. Efeitos da Fisiologia Tireoideana (Eixo Hipotálamo-Hipofisário)	17
2.2. Hipotireoidismo	18
2.3. Hipotireoidismo Congênito.....	20
2.4. Etiologia e Classificação do Hipotireoidismo Congênito.....	21
2.5. Defeitos genéticos na síntese hormonal (Disormonogênese)	22
2.6. Enzima tireoperoxidase (TPO) e mutações.....	23
2.7. PCR-SSCP para rastreamento de mutações	24
3. METODOLOGIA.....	26
3.1. Amostragem.....	26
3.2. Local de Estudo	26
3.3. Coleta.....	26
3.4. Amplificação.....	26
3.5. Sistema de gel.	27
3.6. Análise das Mutações	28
3.7. Análise Estatística.....	28
4. . RESULTADO	29
4.1. Rastreamento de Mutações	29
4.2. Análise do éxon 06	29
4.3. Análise do éxon 07	30
4.4. Análise do éxon 8B.....	31
4.5. Análise do éxon 09	33
4.6. Análise do éxon 10	35
4.7. Análise do éxon 12	36
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

O Hipotireoidismo refere-se à síndrome clínica e bioquímica resultante da diminuição ou ausência da produção e da redução dos níveis circulares dos hormônios tireóideo. No recém-nascido com hipofunção tireóidea os sintomas aparecem gradualmente na vida extra-uterina (WAJCHENBERG, 1992).

O Hipotireoidismo Congênito (HC) é o mais comum distúrbio endócrino mundial com uma constante incidência de 1:3000 a 1:4000 neonatos (MONTANELLI *et al.*, 2009). Acarreta severo retardo no desenvolvimento físico e mental, se não for diagnosticado precocemente e introduzida a terapia substitutiva adequada. Na verdade, a maioria das crianças com HC parecem normais ao nascimento e os sintomas clínicos aparecem apenas depois de algumas semanas.

Os primeiros estudos mostraram, repetidamente, que o déficit cognitivo no HC está correlacionado com o lapso de tempo no diagnóstico e início do tratamento (DJEMLI *et al.*, 2006). No entanto, a incidência do HC melhorou de forma que desde a implantação do Programa Nacional de Triagem Neonatal - Teste do Pezinho, mais raramente se observa na população infantil, casos graves de HC com toda sua abrangência de sinais e sintomas clínicos (MEDEIROS-NETO e KNOBEL, 2008).

A principal causa do HC com 85% é a disgenesia, que corresponde à alterações no desenvolvimento da glândula tireóide que podem surgir a partir de mutações em genes que codificam fatores de transcrição tireoidianos: *PAX8*, *TTF1*, *TTF2*, assim como mutações inativadoras do gene do receptor do Hormônio Estimulante da Tireóide – (TSH) (VAISMAN *et al.*, 2004).

A segunda causa mais frequente, com 10-15%, da síndrome congênita é a disormonogênese devido a anormalidade na biossíntese dos hormônios. Outras causas incluem a administração de iodetos durante a gravidez, uso materno de drogas antitireóideas, tratamento materno para tirotoxicose com radioiodo e deficiência crônica de iodo (WAJCHENBERG, 1992). O iodo é o componente raro e indispensável nos hormônios da tireóide, que por sua vez, é essencial para o correto desenvolvimento e maturação do cérebro. Deve ser ingerido na dieta cuja as principais fontes de iodo na alimentação é através do leite, carnes, peixe, sal e água (MORENO *et al.*, 2008).

São vários os genes candidatos na disormonogênese como *TPO* (Tireoperoxidase), *Tg* (Tireoglobulina), *NIS* (Simportador de Na/I), *PDS* (Pendrina),

THOX₂ (Dual oxidase 2). No entanto, de acordo com Rodrigues *et al.* (2005) e Neves (2008), entre as alterações mais frequentes na síntese dos hormônios destaca-se defeitos na atividade da tireoperoxidase (TPO). Esta é uma hemoproteína glicosilada localizada na região apical da membrana, responsável pela iodação de resíduos de tirosina na Tg para síntese dos Hormônios Tireoideanos (HT), T₃ e T₄. O grupo heme é composto por um anel porfirínico no qual se acomoda em seu centro um átomo de ferro (produz interações necessárias para o transporte e regulação do oxigênio no organismo) ligado a quatro átomos de nitrogênio.

Deficiências ocasionadas por mutações no gene TPO, na disormonogênese, são as mais comuns causas responsável por mais de 50% dos casos descritos de HC que levam a erros na organificação de iodeto, podendo ser total ou parcial, dependendo da localização e do tipo da mutação (TURKKAHRAMAN *et at.*, 2010). Defeitos na TPO são normalmente herdados de uma herança autossômica recessiva.

Mediante contexto, se faz necessária a análise molecular do gene TPO em diferentes populações para permitir a identificação das mutações endêmicas da região bem como um possível efeito fundador. O conhecimento das mutações específicas de uma região possibilita a produção de um método de diagnóstico molecular específico para alterações no gene tireoperoxidase. O diagnóstico precoce melhora a qualidade de vida dos pacientes e evita danos permanentes como o retardo psicomotor.

Com esse objetivo, estudamos o perfil da população paraibana para rastrear mutações no gene da tireoperoxidase (TPO) através da técnica de SSCP (Polimorfismo de Conformação de Fita Simples) nos éxons 06, 07, 8B, 09, 10 e 12, em pacientes com HC acompanhados pelo serviço de endocrinologia do Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC) na cidade de Campina Grande – Paraíba, para ter o conhecimento molecular deste gene na população estudada.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A Glândula Tireóide

Durante o desenvolvimento embrionário, a primeira glândula endócrina que surge é a tireóide (PERONE *et al.*, 2004). Esta é a maior glândula do corpo humano, normalmente pesando de 15 a 20 gramas em adultos (GUYTON e HALL, 2006), responsável pela produção de Hormônios Tireoideanos (HT): triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4), que estão envolvidos em diversos componentes da homeostase como função cerebral, cardiovascular, intestinal, metabolismo celular e produção de calor (MARINHO e FIGUEIRA, 2009).

A tireóide localizada no pescoço, na face anterior da traquéia, entre a cartilagem cricóide e o estreito supraesternal tem como principal função produzir hormônios essenciais para o crescimento, controle no consumo de energia, desenvolvimento e maturação de vários órgãos. Para que ocorra a produção normal desses hormônios é necessário um desenvolvimento padrão da glândula, ou seja, regulação e funcionamento adequado na biossíntese e captação de iodo, sendo este último constituinte e regulador da glândula (RODRIGUES, 2004).

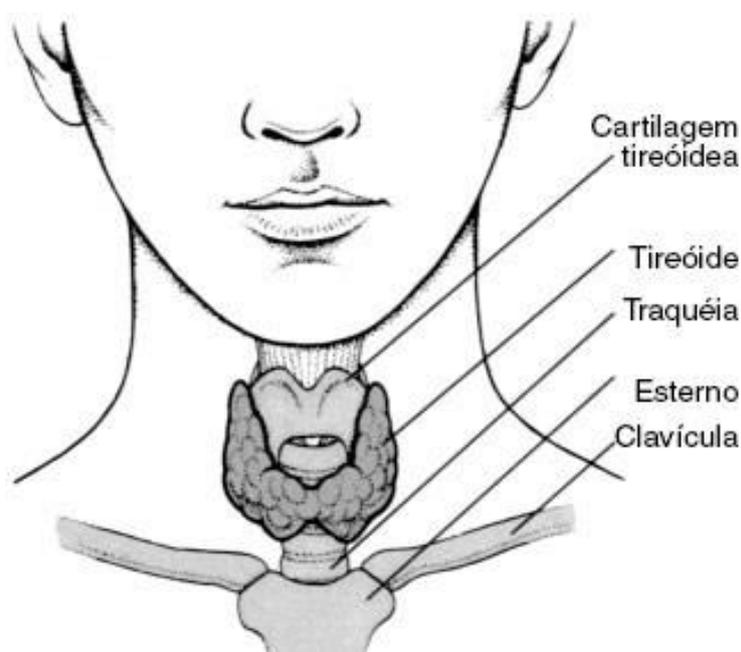


Figura 1: Glândula Tireóide; Fonte: GONFINETTI, 2011.

Histologicamente, a glândula é composta por uma infinidade de folículos esféricos (Figura 2), que são unidades funcionais da tireóide denominada colóide, formados por um epitélio de células cúbicas especializadas em produzir hormônios tireoideanos (HT).



Figura 2: Epitélio folicular da tireóide; Fonte: MARINHO e FIGUIERA, 2009.

O colóide é composto principalmente pela tireoglobulina (Tg), que é uma glicoproteína alvo da ligação do iodo para originar a iodotirosina: moniodotirosina (MIT) e a diiodotirosina (DIT), que são precursoras dos HT (RODRIGUES, 2004).

As células que compõe os folículos tireoideanos são especializadas em sintetizar, armazenar e eliminar os hormônios tireoideanos. Estes provêm do aminoácido tirosina e contém 60-65% do elemento iodo em sua composição.

2.1.1. Hormônios Tireoideanos: síntese e secreção

As células do epitélio folicular possuem dois pólos e, portanto, duas membranas: membrana apical, disposta para o lúmen folicular ou 'colóide', e a membrana basal, voltada para o interstício e capilares (Figura 3). A biossíntese dos HT ocorre em torno da membrana apical, onde se encontra a enzima determinante de todo o processo, a tireoperoxidase (TPO), localizada em suas microvilosidades (MARINHO e FIGUEIRA, 2009).

Os hormônios tireoideanos tiroxina (T_4) e triiodotironina (T_3) são secretados sob o estímulo da tirotrópina hipofisária, ou seja, sob a influência estimulatória do hormônio

estimulante da tireóide ou TSH (LAVIN, 2006). Eles são formados pela iodação da tirosina da tireoglobulina (Tg) da própria célula tireóide, sendo posteriormente secretada e armazenada no lúmen folicular (colóide). A tireoglobulina (Tg) é uma importante glicoproteína sintetizada pela tireóide, que funciona como uma matriz para a síntese do hormônio nesta glândula (RUBIO *et al.*, 2008).

A captação do iodeto plasmático é a primeira etapa da síntese dos HT, o iodo (I^2) ingerido é convertido a iodeto (I) e absorvido pela corrente sanguínea rapidamente (OLIVEIRA, 2009).

Quatro proteínas principais são expressas na célula folicular da tireóide: o receptor da tireotrofina (R-TSH), o co-transportador (simpoter) Na/I (NIS), a tireoperoxidase (TPO) e a tireoglobulina (Tg). A biossíntese dos hormônios da tireóide envolve uma sequência de etapas, nas quais cada uma dessas proteínas apresenta papel fundamental. A ação do TSH é o principal fator regulador da produção e secreção dos HT pela célula folicular da glândula. A ação do hormônio ocorre através da ligação do seu receptor R-TSH na membrana apical. A proteína NIS faz a captação do iodeto pela célula folicular pelo co-transporte ativo dos íons sódio (Na^+) e iodeto (I) para a porção intracelular (CAPEN, 2000).

Através do carreador Na/I, sob o transporte ativo, é possível garantir uma concentração de iodeto livre 30-40 vezes maior que a do plasma (MARINHO e FIGUEIRA, 2009). O I capturado pela célula folicular migra para a superfície apical, onde será oxidado pela enzima tireoperoxidase (TPO) que atua catalisando:

- Reações de oxidação do iodo: combinando iodeto com o peróxido de oxigênio H_2O_2 ;
- Iodação dos resíduos de tirosina da tireoglobulina: formando as iodotirosinas (MIT, monoiodotirosina e DIT, diiodotirosina);
- Acoplamento das iodotirosinas: formando os hormônios tireoideanos, T_3 e T_4 ;

A junção de uma molécula de monoiodotirosina (MIT) com diiodotirosina (DIT) forma Triiodotironina ou T_3 e duas de DIT, unidas, formam Tiroxina ou T_4 (RODRIGUES, 2004). Os hormônios caem na circulação, sendo 20% de T_3 liberado pela glândula tireóide e o restante produzido pela desiodação do hormônio T_4 em tecidos

adjacentes. Após a formação dos HT que são armazenados na tireoglobulina iodada, estes hormônios são liberados da glândula tireoideana por endocitose.

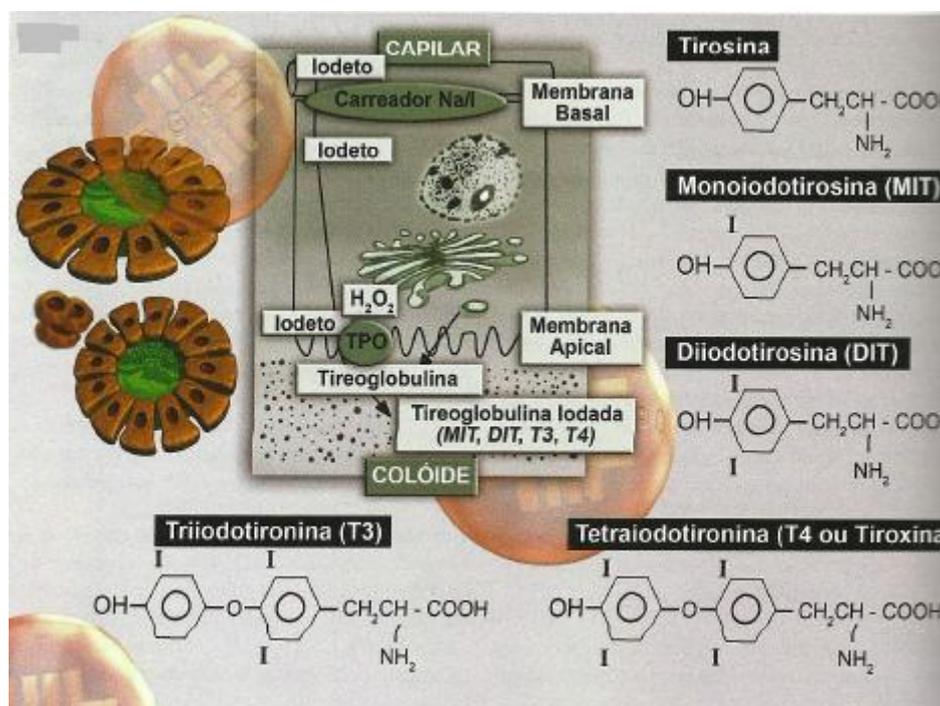


Figura 3: Síntese dos hormônios tireoideanos; Fonte: MARINHO E FIGUEIRA, 2009.

Conforme Guyton e Hall (2006), a superfície apical das células tireoideanas emite pseudópodos que cercam porções pequenas de colóide, formando vesículas pinocíticas que penetram no ápice da célula. Logo, os lisossomos presentes no citoplasma celular imediatamente se fundem com as vesículas, resultando em vesículas digestivas que contêm as enzimas digestivas dos lisossomos misturadas com o colóide. Inúmeras proteases entre as enzimas digerem as moléculas de tireoglobulina e liberam tiroxina e triiodotironina em sua forma livre. Então, estas se difundem através da base da célula tireoideana para os capilares adjacentes, sendo os HT liberados no sangue. Cerca de três quartos da tirosina iodada na tireoglobulina jamais se torna hormônio, permanecendo como MIT e DIT.

Os hormônios tireoideanos permanecem armazenados no colóide, ligados à Tg, e quando necessário são liberados. A taxa diária de tiroxina é cerca de 90% dos hormônios secretados pela tireóide e apenas 7% por triiodotironina (GUYTON e HALL, 2006), em poucos dias a metade da tiroxina é desiodada, formando mais triiodotironina. Portanto, o hormônio T_3 é o responsável pela atividade fisiológica nos

tecidos. Pode-se considerar o T_4 como um pró-hormônio e o T_3 como o hormônio ativo (MARINHO e FIGUEIRA, 2009).

Os hormônios tiroxina e a triiodotironina ao serem liberados no sangue se combinam rapidamente com diversas proteínas plasmáticas. A ação do hormônio T_3 ocorre cerca de quatro vezes mais rápido que a do T_4 , com um período de latência de apenas 6 a 12 horas.

2.1.2. Efeitos da Fisiologia Tireoideana (Eixo Hipotálamo-Hipofisário)

A produção de hormônios tireoideanos é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireóide bem como quase todo o sistema endócrino humano e o TSH, denominado de tireotrofina, também é um hormônio produzido pela glândula pituitária (MARINHO e FIGUEIRA, 2009). Esta glândula recebe estímulos que induzem a liberação de hormônios que tem seu efeito em várias partes do organismo (RODRIGUES, 2004). Os neurônios hipotalâmicos sintetizam e liberam o TRH (Hormônio liberador de tireotrofina) que chega à circulação hipofisária, irriga as células e, entre elas os tireotróficos (células que produzem o TSH). Os efeitos do TSH sobre a tireóide incluem (MARINHO e FIGUEIRA, 2009; GUYTON e HALL, 2006):

- Estímulo à síntese de hormônio tireoideano: aumento da síntese da enzima tireoperoxidase (TPO), da tireoglobulina (Tg) e do carreador Na/I (NIS);
- Estímulo à liberação de hormônios tireoideanos: aumenta a reabsorção do colóide contendo a Tg iodada, bem como a atividade lisossômica, resultando em maior demanda de hormônio liberado e secretado;
- Efeito Trófico: promove a hipertrofia das células foliculares e aumento da vascularização da glândula;

A síntese e secreção do TSH são estimuladas pelo TRH que é secretado pelos neurônios hipotalâmicos. A produção destes hormônios (TSH) é controlada pelos níveis de T_3 e T_4 . Quando o nível de triiodotironina e tiroxina aumenta, inibe a produção de TSH e TRH que desse modo deixa de estimular as células epiteliais da tireóide diminuindo a síntese e secreção dos HT. Quando esses níveis decaem no sangue, não há

produção de TSH e TRH, voltando a existir estímulo nas células epiteliais. Este processo é conhecido como eixo Hipotálamo-Hipofisário (RODRIGUES, 2004).

O iodo desempenha papel central na fisiologia da tireóide sendo um importante componente dos HT e um regulador da função da tireóide. Todas as etapas seguintes da biossíntese, organificação do iodeto para a secreção do T_3 e T_4 na circulação, são estimulados pelo TSH e inibida pelo iodo em excesso (CAVALIERI, 1997).

2.2. Hipotireoidismo

A relação inversa e dinâmica entre os níveis de TSH, T_3 e T_4 sérico determinam uma elevação ou supressão hormonal. A concentração elevada de TSH inibe a síntese de HT, o que implica uma baixa dosagem de T_3 e T_4 , fator essencial para o diagnóstico de hipotireoidismo. Predominantemente, a mensuração de HT livre corresponde a sua viabilidade biológica.

O Hipotireoidismo é uma síndrome clínica ocasionada pela deficiência ou ausência dos hormônios tireoideanos que dependendo do grau e da duração da deficiência destes, afeta os tecidos em maior ou menor proporção, promovendo assim um retardo nos processos metabólicos. Os maiores danos ocorrem durante a vida uterina, sendo os hormônios da tireóide essencial no desenvolvimento cerebral do feto nos primeiros meses de gestação (OLIVEIRA, 2009).

Pode-se classificar o hipotireoidismo em primário, onde há falência na função tireoideana; secundário, tendo como causa a deficiência de TSH – causa hipofisária, ou terciário, manifestado pela deficiência hipotalâmica de TRH. O modo secundário e terciário pode ser caracterizado como hipotireoidismo central (MARINHO e FIGUIERA, 2009).

Lavin (2006) descreve que pelo fato dos HT afetar o crescimento e desenvolvimento, além de regular vários processos celulares, a ausência ou deficiência de hormônio tireoideano apresenta muito prejuízo para o indivíduo acometido por esta síndrome podendo comprometer:

- I. Sistema nervoso: queixas de esquecimento, memória reduzida, alentecimento mental, depressão, redução da audição, contraturas de tendões mostram relaxamento alentecido.

- II.** Sistema renal: o fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular são reduzidos, logo, uma redução na excreção de água pode ser associada à hiponatremia.
- III.** Sistema gastrointestinal: a constipação no hipotireoidismo é comum. Ocorre acloridria associada à anemia perniciosa.
- IV.** Sistema cardiovascular: pode ocorrer bradicardia, reduzido débito cardíaco, miocárdio flácido, derrame pleural, edemas em membros inferiores e cardiomegalia.
- V.** Sistema metabólico: hipotermia, intolerância à temperatura fria, aumento no nível do colesterol, ganho de peso apesar da redução na ingestão alimentar, mas a obesidade grave é raramente desenvolvida pelo hipotireoidismo.
- VI.** Sistema pulmonar: o hipotireoidismo grave pode causar retenção de dióxido de carbono. Os derrames pleurais possuem um elevado conteúdo protéico.
- VII.** Sistema reprodutor: A menstruação pode se tornar escassa e cessar completamente devido à secreção deficiente de gonadotrofinas. Em adolescentes pode haver amenorréia primária. A hiperprolactinemia ocorre pela ausência do efeito inibitório do hormônio tiroideano sobre a secreção da prolactina.
- VIII.** Sistema musculoesquelético: derrames articulares, câimbras musculares e músculos rígidos.
- IX.** Hemopoese: a anemia megaloblástica sugere a anemia perniciosa coexistente.
- X.** Pele e cabelo: pele seca e fria é comum, acúmulo de ácido hialurônico na pele e nos tecidos subcutâneos, causando retenção de sódio e água. A face é inchada e as feições grosseiras. Pele com aspecto amarelado e possivelmente descamada. O cabelo não tem brilho, as sobrancelhas laterais se afinam, e o pêlo corporal é escasso.
- XI.** Desenvolvimento: o crescimento e desenvolvimento das crianças são retardados devido à secreção do hormônio do crescimento ser deficiente, pois o HT é indispensável para a síntese do hormônio do crescimento. O hipotireoidismo não tratado em gestantes pode resultar em função intelectual comprometida na progênie.

- XII.** Glândula tireóide: o alargamento da glândula em crianças pequenas com hipotireoidismo induz um defeito biossintético.

2.3. Hipotireoidismo Congênito

O Hipotireoidismo Congênito (HC) é a mais comum doença endócrina na infância com prevalência mundial de 1:3000 a 1:4000 nascidos vivos (MORENO *et al.*, 2002; AVBELJ *et al.*, 2007), causados por disgenesia ou alterações na hormonogênese tireóidea que podem ser provocados por mutações em genes das proteínas envolvidas, a ausência de diagnóstico e tratamento podem causar retardo mental grave e irreversível. Em adultos com menos de 65 anos, a incidência é de aproximadamente 10%, na população em geral é de 1 a 2% (LAVIN, 2006). A disormonogênese também pode resultar em aumento da tireóide (bócio) devido a níveis elevados de TSH (TARGOVNIK *et al.*, 2011).

A causa mais comum para o HC é a ausência de iodo. Em regiões em que a quantidade de iodo é suficiente a disgenesia é a causa mais comum. O HC está associado à disormonogênese, síntese dos hormônios da tireóide, em 10 a 15% dos casos, e 85% associado ao desenvolvimento da tireóide, disgenesia (RUBIO *et al.*, 2008; KOTANI *et al.*, 1999). O diagnóstico do Hipotireoidismo Congênito é baseado no nível elevado do hormônio TSH ($>20\mu\text{U/ml}$) e diminuição do nível de T_4 ($<6.5\ \mu\text{g/dl}$) (RODRIGUES *et al.*, 2005; BAKKER *et al.*, 2000). No entanto, a causa mais prevalente de defeitos hereditários do metabolismo da tireóide consiste na deficiência da tireoperoxidase (TPO) em 50% dos casos (ABRAMOICZ *et al.*, 1992).

Tendo-se verificado a importância dos HT na regulação do metabolismo corporal por toda a vida e a sua necessidade crucial para o crescimento do sistema nervoso central fetal e durante os três primeiros anos, o diagnóstico precoce e a substituição dos hormônios tireoideanos evitam danos às crianças afetadas.

A ausência dos hormônios nos primeiros anos de vida resulta em retardo mental e outras seqüelas neurológicas. Grande parte da incidência do hipotireoidismo congênito não é hereditária. Portanto, não é possível identificar mulheres grávidas de alto risco que poderiam dar à luz a um bebê com HC (LAVIN, 2006). Além disso, as manifestações clínicas dessa síndrome, frequentemente são sutis ou inespecíficas, ou até

mesmo ausentes, de modo que essas condições não é observada ou diagnosticada no período neonatal.

Conforme Ramos *et al.* (2003), em 1989 foi regulamentado em Campina Grande - Paraíba o Programa de Triagem de doenças congênitas o qual estabeleceu a obrigatoriedade do teste em todas as crianças nascidas vivas com finalidade da triagem em fase pré-sintomática, no entanto a triagem foi iniciada em 1998. No município, o teste de rastreamento é realizado em instituições públicas e privadas.

A sintomatologia é rara e não específica em recém-nascidos. Djemli *et al.* (2006) relata que a severidade da doença vai depender do tempo que a criança esteve sujeita a um estado de hipofunção tireoideana podendo desenvolver um quadro clínico severo, tal como: hipotonia, mixedema, distensão abdominal, bradicardia, dificuldade em se alimentarem, choro rouco, macroglossia, icterícia prolongada, septo nasal incompleto, fontanelas posteriores alargadas, obstipação, hipotermia, atraso na maturação óssea e hérnia umbilical.

Além da confirmação laboratorial, o diagnóstico pode ser reforçado pela evidência radiológica de idade óssea retardada. A presença de bócio congênito pode ser o primeiro indício clínico de possível erro inato do metabolismo da síntese hormonal da tireóide (WAJCHENBERG, 1992).

2.4. Etiologia e Classificação do Hipotireoidismo Congênito

O iodo é o componente essencial dos hormônios tireoideanos (MORENO *et al.*, 2008). Perone *et al.* (2004) afirma que o HC é uma doença que em regiões iodo-suficientes é a principal causa do retardo mental. Sua frequência é variável, dependendo de fatores dietéticos e geográficos, características genéticas da população e a faixa etária dos pacientes. Porém, segue-se que a ingestão adequada de iodo é um pré-requisito para a síntese normal de HT.

O Hipotireoidismo Congênito pode ser classificado em quatro grupos principais: hipotireoidismo permanente esporádico, hipotireoidismo permanente primário, hipotireoidismo permanente hipotalâmico-pituitário e hipotireoidismo transitório (FOLLEY, 2000). O HC pode ser permanente quando a ineficácia na produção de hormônios da tireóide permanece por toda a vida, e transitório quando identificado no momento do rastreio, e desaparece espontaneamente. Evidências sugerem que a forma

esporádica ocorra, na maioria dos casos, devido a mutações no fator de transcrição nos genes TTF-1, TTF-2 e PAX-8 (PERONE *et al.*, 2004). O HC primário corresponde à tireóide lesionada ou incapaz de produzir a quantidade normal de T₃ e T₄. Pode ocorrer por condições hereditárias, cuja síntese dos hormônios é insuficiente ou por remoção ou destruição do tecido tireóideu. O hipotireoidismo transitório ocorre pelo déficit de iodo na alimentação, pois uma vez estabelecida a quantidade de iodo necessário na dieta, a produção de HT é normalizada. Outra causa é a exposição materna ou neonatal ao iodo além da passagem de anticorpos através da placenta que inibem a ligação do TSH ao receptor no feto (RODRIGUES, 2004).

2.5. Defeitos genéticos na síntese hormonal (Disormonogênese)

A disgenesia tireóidea (DT), anomalia que ocorre na embriogênese da glândula tireóide, é a causa mais freqüente do HC (NEVES, 2008), com 85% dos casos. Os outros 10 a 15% dos pacientes com hipotireoidismo congênito decorrem da deficiência na síntese dos hormônios da tireóide, disormonogênese. O variado número de defeitos genéticos resulta de mutações em genes envolvidos na síntese, armazenamento, secreção, transporte ou na utilização dos HT.

O HC causado por disormonogênese está ligado a muitos genes podendo destacar alteração na enzima tireoperoxidase (TPO), comprometendo a ligação do iodeto à Tg, defeitos no gene NIS, PDS, THOX₂.

Estudos de ligações genéticas estabeleceram a relação entre o defeito de incorporação de iodeto e mutações no gene da TPO, com padrão de herança recessiva, comprometendo os dois alelos, um em cada cromossomo, para que ocorra falha na atividade catalítica da enzima (NEVES, 2008), onde no homocigoto o hipotireoidismo é precoce e severo. No entanto, alguns casos podem ser devido à expressão monoalélica do alelo mutante, com isso o defeito genético está confinado para uma geração e, é portanto, não herdada (DELADOËY *et al.*, 2008). Nos indivíduos presumivelmente heterocigotos, o distúrbio é, usualmente, brando e acompanhado de graus variáveis de aumento tireóideo (WAJCHENBERG, 1992).

2.6. Enzima tireoperoxidase (TPO) e mutações

A Tireoperoxidase (TPO) está ligada à membrana apical das células da tireóide onde desempenha a função de catalisar a iodação e acoplamento posterior dos resíduos de tirosina na Tg, resultando na síntese dos hormônios T₃ e T₄ (BIKKER *et al.*, 1997).

O gene TPO de 150 kilobases (Kb) de tamanho, contém 17 éxons e 16 íntrons, está localizado no cromossomo dois, locus 2p25 (BAKKER *et al.*, 2000; DELADOËY *et al.*, 2008). O sítio ativo da proteína é composto pelos éxons 08, 09 e 10 do gene, e seu RNAm contém 3048 pares de bases e codifica 933 aminoácidos (KIMURA *et al.*, 1989). A enzima é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso da célula folicular e transferida para o complexo de Golgi. Responsável, na hormonogênese, pela oxidação de íons iodeto, iodação da tireoglobulina e acoplamento das tirosinas ionizadas (coupling) para a formação dos hormônios T₃ e T₄ (NEVES, 2008).

É uma enzima importante para a síntese dos hormônios da tireóide, e seus defeitos são considerados como causa prevalente de alterações congênitas no metabolismo da glândula. Mutações na TPO geralmente são transmitidas por herança autossômica de caráter recessivo (ABRAMOWICZ *et al.*, 1992). Mutações inativadoras desse gene levam a defeitos da organificação de iodeto, que pode ser total ou parcial, dependendo da localização e do tipo da mutação (TURKKAHRAMAN *et al.*, 2010).

Mutações no gene da TPO mostram associação com doenças da tireóide, como disormonogênese, bócio congênito, hipotireoidismo congênito, defeito na organificação de iodeto entre outras. Estudos moleculares do gene TPO confirmam a importância, da proteína, em funções fisiológicas (WANG *et al.*, 2010).

Diferentes alterações genéticas que causam Hipotireoidismo Congênito têm sido caracterizadas, entre elas as mutações no gene TPO (SIMM *et al.*, 2009). Já foram descritas 61 mutações ao longo de todo o gene (RIS-STALPERS e BIKKER, 2010). Na maioria delas, mutações *missense* (codificação de um aminoácido diferentes do normal) e *nonsense* (substituição de um determinado códon pelo códon de terminação), algumas em sítio de *splicing* (inversão de éxons codificando outra proteína), deleções ou inserções.

2.7. PCR-SSCP para rastreio de mutações

Nos últimos anos, a identificação de um grande número de genes em doenças levou a uma considerável melhora clínica, melhor procedimento de diagnóstico, intervenções terapêuticas e prognósticos eficazes, assim como exames pré-sintomáticos para familiares de indivíduos afetados. Como algumas doenças podem estar ligadas a genes conhecidos, tem-se aumentado na última década, a disponibilidade de técnicas simples, de baixo custo e confiável para detectar a mudança na sequência de nucleotídeos (VORECHOVSKY, 2005). Além dos custos, o principal critério de seleção para esse método é a possibilidade de uma técnica para detectar a presença de mutações nas regiões analisadas.

Foram desenvolvidas técnicas para a triagem de éxons mutados, como forma de se evitar o seqüenciamento total do gene, que uma vez detectado seriam seletivamente seqüenciados (JORGE, 2002). A análise Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP) (ORITA *et al.*, 1989) é uma das mais simples metodologia para a detecção de mutações. A variação de uma sequência de DNA é detectada pela alteração na conformação dos fragmentos desnaturados. Baseia-se no princípio de que a conformação tridimensional de fragmentos de DNA fita simples depende da sequência de nucleotídeos, sendo que a diferença de um nucleotídeo altera o padrão de migração eletroforética (MOLINA e TOBO, 2004)

Contudo, moléculas que venham a diferir pela substituição de uma base nucleotídica, podem formar diferentes estruturas em relação ao seu tamanho e superfície, apresentando migração diferente na eletroforese de gel de poliacrilamida desnaturante que possibilita a identificação da variação estrutural que é manifesta pela mudança de mobilidade (GIBSON *et al.*, 1997). Em virtude da diferença de mobilidade eletroforética de um fragmento de DNA contendo uma ou mais bases diferenciadas, é possível visualizar os heteroduplex. Estes são sequências variantes, que aparecem como bandas com diferentes deslocamentos eletroforético (GIBSON *et al.*, 1997).

O SSCP possui dois métodos de revelação, o radioativo e não-radioativo. O não radioativo, pode ser utilizado coloração pela prata, que é bastante utilizado devido a sua praticidade, menor risco e maior sensibilidade. Esta coloração é um método extremamente sensível de impregnação permanente de ácidos nucléicos em géis de poliacrilamida.

A natureza das bases diferenciadas é a determinante imperiosa para a capacidade de detectar as mutações, devido à separação dos fragmentos. Desse modo, uma vez identificada a região do gene alterada o sequenciamento será sugerido.

Atualmente o SSCP vem sendo utilizado para detectar mutações em genes responsáveis por inúmeras doenças hereditárias, mutações somáticas em oncogenes, sendo útil também na detecção de polimorfismo ligados a genes de interesse (JORGE, 2002).

3. METODOLOGIA

3.1. Amostragem: Estudo tipo paciente-controle no qual foram analisadas 25 amostras de pacientes com Hipotireoidismo Congênito, por disormonogênese, com diagnóstico clínico e laboratorial confirmado, e 22 amostras de pacientes (controles) normais para o Hipotireoidismo Congênito. Os grupos foram pareados conforme gênero e idade, respectivamente. Todos assinaram um termo de consentimento para utilização das amostras para pesquisa científica. A pesquisa foi avaliada e aprovada pelo comitê de ética do Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC).

3.2. Local de Estudo: O trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biologia Molecular (BIOMOL) do HUAC no município de Campina Grande, Paraíba.

3.3. Coleta: 5ml de amostra de sangue periférico de cada paciente com Hipotireoidismo Congênito, e seus respectivos controles, foram coletados na sala de coleta do BIOMOL do Hospital Universitário Alcides Carneiro – HUAC. A extração do DNA genômico, que foi realizada através do kit de extração de DNA ILLUSTRATION BLOOD GENOMICPREP MINI SPIN KIT - 28-9042-64 - GE Healthcare, seguindo o protocolo indicado pelo mesmo.

3.4. Amplificação: As amplificações das amostras com os éxons 06, 07, 8B, 09, 10 e 12 foram realizada nas seguintes condições:

- ✓ Solução Pré-mix (20µl):
 - 10µl de Água Mili-q
 - 4µl de Tampão IVB (5x) (Phoneutria) - Tampão especial para PCR
 - 1,6µl de dNTP (200mM)
 - 1,6µl de Iniciador Direto (0,8 pMol)
 - 1,6µl de Iniciador Reverso (0,8 pMol)
 - 0,5µl de Taq DNA Polimerase (5U/µl) (Phoneutria)
 - 1µl de DNA molde

As amostras foram amplificadas no termociclador TECGENE, da marca Techine. O programa consiste em desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos seguidos de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 57°C, 1 minuto a 72°C e extensão final de 10 minutos a 72°C. A temperatura utilizada (57°C) foi a mesma para todos os iniciadores. O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida com glicerol.

3.5. Sistema de gel: A técnica utilizada foi Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP) utilizando o produto da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% e glicerol 5% desnaturante em sistema de géis verticais, em que o tampão utilizado foi TBE a 1%. A análise foi realizada para rastrear a presença de mutações nos éxons 06, 07, 8B, 09, 10 e 12.

✓ Solução gel de Poliacrilamida 10% (Gel desnaturante – 5% de Glicerol):

- 13,3ml de Poliacrilamida 30%
- 20ml de tampão TBE 10x (Tris-Borato- EDTA)
- 2ml de Glicerol
- 4,7ml de Água Destilada
- 300µl de Persulfato de Amônia;
- 30µl de Temed;

Com a polimerização de 30 minutos a temperatura ambiente, o gel foi submetido a uma pré-corrída de 15 minutos sem amostras.

Às amostras foram adicionado 5µl de formamida para cada 5µl de fragmento amplificado, amplicon. Todas as amostras foram desnaturadas a 95°C durante 5 minutos e posteriormente acondicionadas em gelo, choque térmico, para a permanência da desnaturação dos fragmentos.

Os géis foram submetidos a uma tensão de 50 Volts e corrente de 10mA em temperatura de aproximadamente 4°C (dentro da geladeira) por 24 horas. Para a revelação dos géis foi utilizado o método convencional de coloração pelo nitrato de prata que consiste de três etapas: a fixação, onde o gel é tratado com ácido no intuito de reter as moléculas para que elas não difundam durante a coloração, a impregnação pela

prata, onde o gel é tratado com nitrato de prata, e a revelação onde se utiliza uma solução com formaldeído que reduz o íon prata em prata metálica. Cada etapa com tempo máximo de 10 minutos.

3.6. Análise das Mutações: Foram realizadas através da técnica de Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP) dos éxons 06, 07, 8B, 09, 10 e 12 do gene TPO, os iniciadores utilizados foram descritos por Rodrigues (2004) (Tabela 1).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação dos éxons em estudo.

Éxon	Seqüência (5' → 3')	Temperatura	Tamanho do fragmento
6(F)	act gct tct gtg ttc ttc tcc c	57°C	258
6(R)	aag gct att tcc ctc cct ca		
7(F)	ggt cat ctt tct gct acc ac	57°C	391
7(R)	ctg cta ccc ctg gga ata gg		
8B(F)	atg aac ggg ttg acc tegtt	57°C	480
8B(R)	ggagag aga agc cac gat gc		
9(F)	gaa gat gct ctt cca cac tgc	57°C	373
9(R)	aga gtt cat ggg gac cag c		
10(F)	ctg agc caa gag ctg tcc tt	57°C	252
10(R)	cag ctg cat gag gtg tgc		
12(F)	ctg tgg gca gct ggt ctt	57°C	369
12(R)	aat cag ctc ctg ggg aag at		

Fonte: RODRIGUES, 2004.

3.7. Análise Estatística: Foram feitas análises da estatística descritiva pelo teste de pareamento T-Student através do programa online Student's T-Test disponível em: www.studentsttest.com/.

4. RESULTADOS

4.1. Rastreamento de Mutações

Nos 25 pacientes estudados, o rastreio molecular do gene da TPO foi efetuado por SSCP, que posteriormente será seguido de sequenciamento para confirmação das possíveis mutações identificadas. A identificação dos perfis eletroforéticos alterado por SSCP foi eficiente, o resumo dos resultados está descrito abaixo (ver tabela 2).

Em nosso estudo, alguns pacientes são familiares, constatando três famílias distintas: Família A: paciente 1, 4 e 7; Família B: paciente 6, 13, 14 e 18; Família C: paciente 5 e 12.

Na análise das amostras o parâmetro para seleção foi utilização do padrão de mobilidade eletroforético do controle negativo, que é normal para o HC, para cada éxon no intuito de possibilitar a comparação com os demais perfis. Novos grupos foram formados à medida que características diferentes surgiram, fator essencial na determinação de outros perfis.

4.2. Análise do éxon 06

No éxon 06 (Figura 4), as amostras apresentaram um mesmo perfil de migração dos fragmentos para todas as amostras analisadas em pacientes.

Da mesma forma, todos os fragmentos do DNA-controle apresentaram o mesmo padrão de banda. Neste caso, curiosamente, não houve a incidência de heteroduplex.

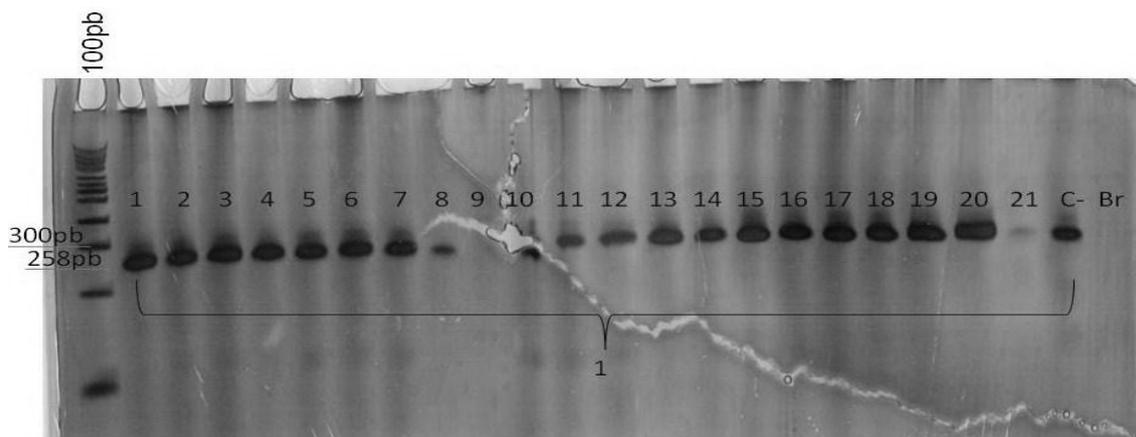


Figura 4: Gel de Poliacrilamida 10% (desnaturante Glicerol 5%) para o éxon 06; Canaleta 1 a 21 representa os pacientes; a numeração abaixo dos fragmentos indica o padrão de migração diferenciado entre os demais; Padrão (1): banda padrão.

4.3. Análise do éxon 07

Na análise do éxon 07, tomando como base o padrão do controle negativo que convergiu com o padrão de mobilidade dos hipotireoideos, verifica-se dois perfis distintos entre pacientes e controles, com frequência de 100% para os primeiros, a qual pode ser considerado polimorfismo, porém não considerado padrão polimórfico.

Na figura 5, está representado o perfil 1 que corresponde aos pacientes, não apresentando diferenças entre os analisados. Perfil 2 (Figura 6) corresponde aos controles.

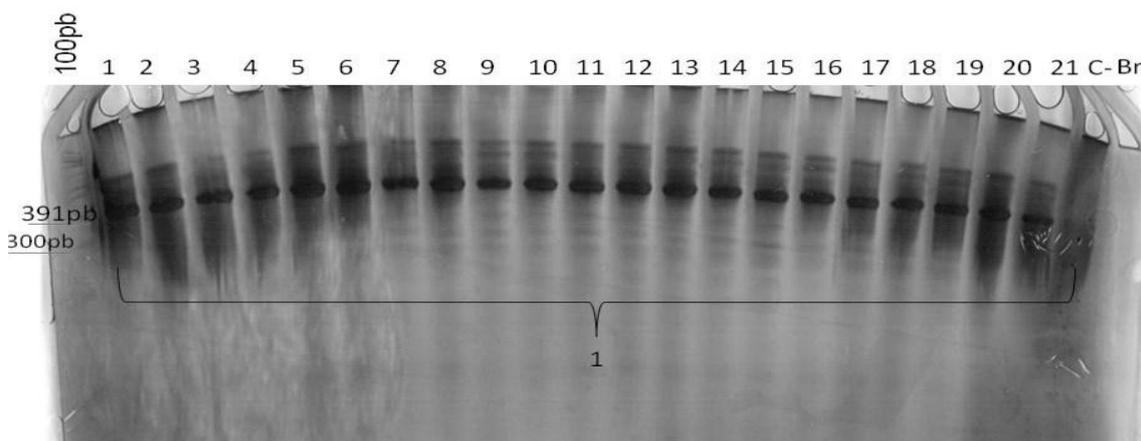


Figura 5: Gel de Poliacrilamida 10% (desnaturante - 5% de Glicerol); Análise dos pacientes para o éxon 07; Canaleta 1 a 21 representa os pacientes; a numeração abaixo dos fragmentos indica o padrão de migração diferenciado entre os controles; Controle negativo (C-); Branco (Br); Padrão (1): 1ª, 2ª, 3ª banda;

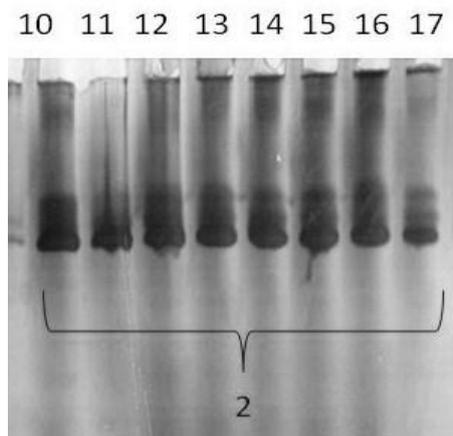


Figura 6: Gel de Poliacrilamida 10% (desnaturante - 5% de Glicerol); Análise dos controles para o éxon 07; Canaleta 10 a 17 representa os controles; a numeração abaixo dos fragmentos indica o padrão de migração diferenciado; Padrão (2): 1ª, 2ª banda.

O gráfico 1 mostra a incidência dos padrões distintos identificados no éxon 07, sendo o perfil 1 apenas os representantes pacientes e o perfil 2, apenas controle.

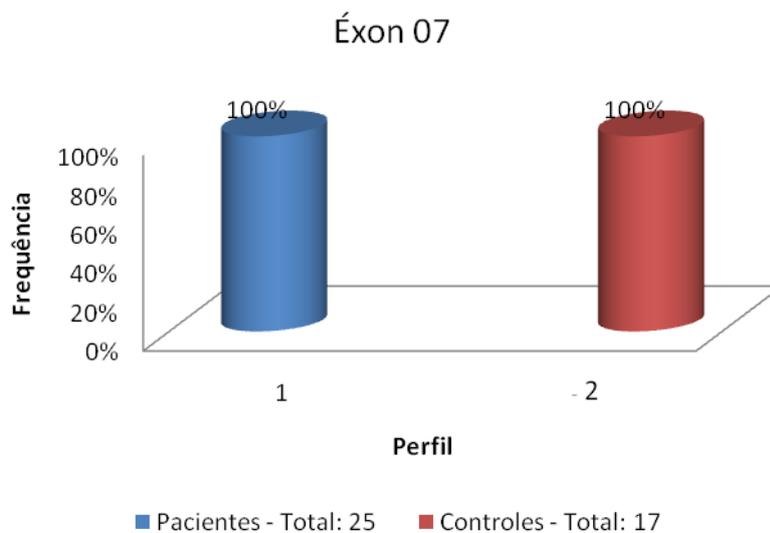


Gráfico 1: Representação da frequência do perfil 1 em pacientes e 2 em controles.

4.4. Análise do éxon 8B

A apresentação dos perfis é caracterizada pelo padrão eletroforético diferenciado. A maioria das supostas mutações detectadas foram encontradas nos éxons 08, 09, 10 e 12. Justificando, com exceção do éxon 12, a incidência de perfis variados pela localização desses éxons no gene TPO, isto é, estes éxons codificam o sítio ativo da enzima, a parte envolvida na ligação heme (BAKKER *et al.*, 2000). Na análise das

amostras dos pacientes para o éxon 8B, o padrão de mobilidade entre os fragmentos (Figura 6 e 7) mostra quatro padrões distintos. O controle negativo mostrou um total de onze bandas, sendo seis bandas padrão com mais quatro abaixo da terceira banda e uma abaixo da sexta, ao qual foi denominado perfil 1. Ainda neste mesmo éxon foi identificado o perfil 2, caracterizado pela ausência da primeira e segunda banda padrão, e o perfil 3, que apresenta as seis bandas padrão, ambos os perfis mostraram frequência de 6%. Já no perfil 4 foi observado as seis bandas padronizadas com adição de dois fragmentos acima da segunda banda padrão, com incidência de 10%. Ver frequência no gráfico 2. Nos indivíduos controles não foi realizada as análises devido a não amplificação da PCR que pode ter sido provocada por contaminação nos componentes da reação, concentração alta de DNA, impureza das amostras, temperatura de anelamento dos primers, entre outros fatores. Logo, o número total dos analisados foi de 18 pessoas, apenas pacientes.

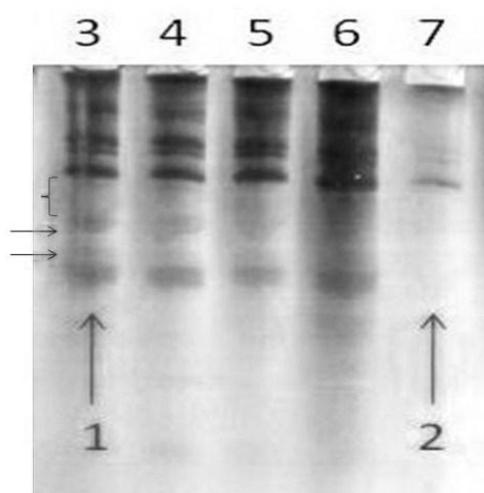


Figura 7: Gel de Poliacrilamida (desnaturante - 5% de Glicerol); Análise dos pacientes para o éxon 8B; Canaleta 1 a 21 representa os pacientes; a numeração abaixo dos fragmentos seguida por setas indica o padrão de migração diferenciado entre os demais; Padrão (1): 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª banda + Quatro abaixo da 3ª banda + Uma abaixo da 6ª banda; (2): 3ª, 4ª, 5ª, 6ª banda.

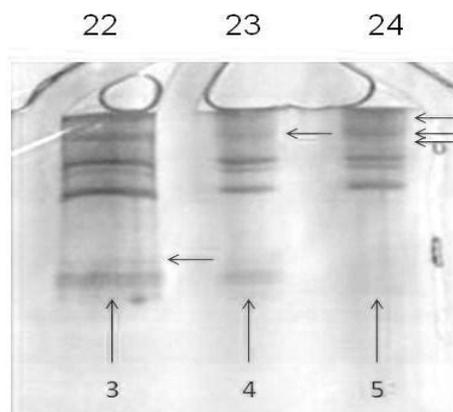


Figura 8: Gel de Poliacrilamida (desnaturante - 5% de Glicerol); Continuação dos pacientes para o éxon 8B; a numeração abaixo dos fragmentos seguido por setas, indicam o padrão de migração diferenciado entre os demais; Padrão (3): 1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 5^a, 6^a banda; Padrão (4): 1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 5^a, 6^a banda + Duas acima da 2^a banda; Padrão (5): 3^a, 4^a, 5^a, 6^a banda.

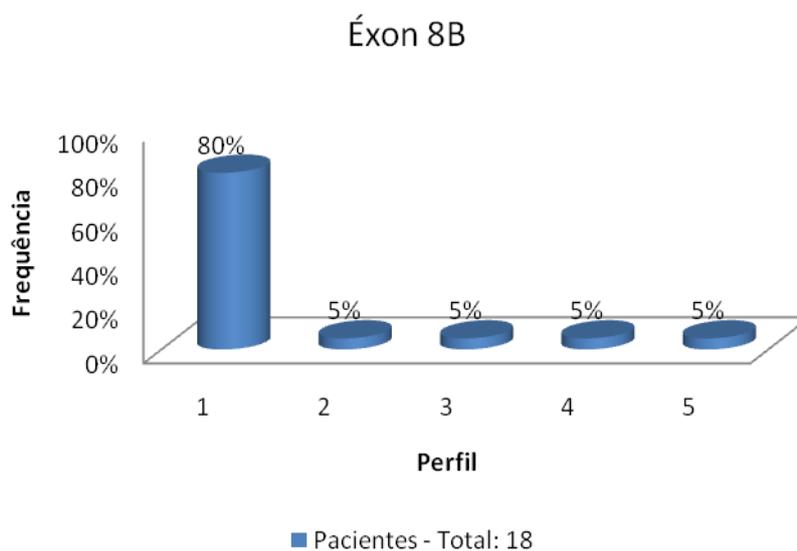


Gráfico 2: Representação da frequência dos perfis 1 ao 5 em pacientes.

4.5. Análise do éxon 09

No éxon 09, foram identificados sete perfis no padrão de migração, sendo seis verificados nos pacientes e um nos indivíduos controles, isto é, todos os indivíduos controles apresentaram mesmo perfil. Isso explica o fato do éxon em questão está localizado no centro catalítico da enzima.

Neste éxon também houve casos em que familiares apresentaram o mesmo perfil, como é o caso dos pacientes 6, 13, 14 e 18 que pertencem a família B.

4.6. Análise do éxon 10

A análise do éxon 10 demonstra que a maioria dos pacientes apresentam perfil 2 com frequência de migração correspondendo a 40% do valor total de incidência dos perfis. Os pacientes 14 ao 18 apresentam o perfil 1 e o paciente 10 com perfil 3. A figura 9 e o gráfico 4 representam o perfil e a incidência, respectivamente citados a cima. O paciente 14 e 18 são parentes, pertencendo a família B.

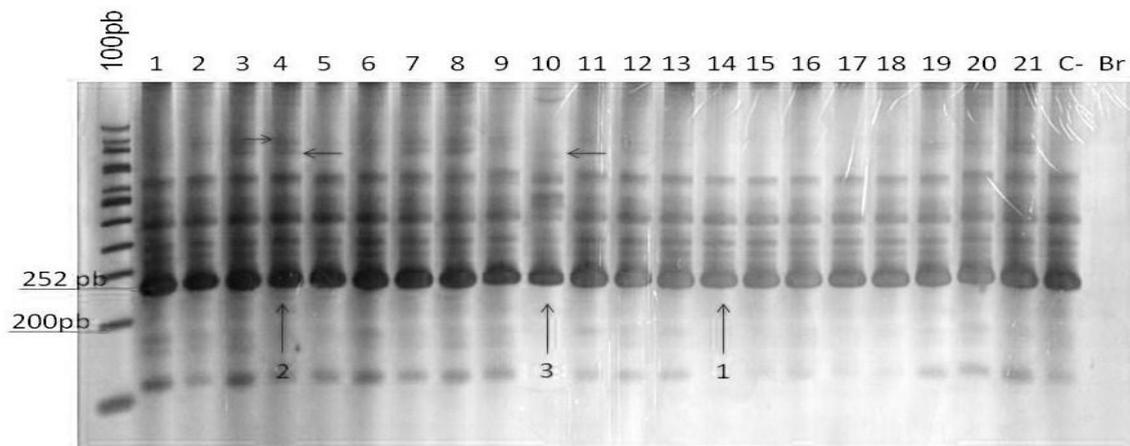


Figura 10: Gel de Poliacrilamida (desnaturante - 5% de Glicerol); Análise dos pacientes para o éxon 10; Canaleta 1 a 21 representa os pacientes; a numeração abaixo dos fragmentos seguida por setas, indica o padrão de migração diferenciado entre os demais; Controle negativo (C-); Branco (Br); Padrão (1): 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª banda; (2): 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª banda + Duas bandas acima da 6ª banda; (3): 1ª, 2ª, 4ª, 5ª, 6ª banda + Uma abaixo da 5ª banda + Uma acima da 6ª banda.

O perfil 4 é representado por apenas um indivíduos controle (C10) que não é portador do hipotireoidismo congênito, representando 2% em sua frequência. Como mostra no gráfico. Considerou-se o perfil 1, devido ao parentesco que existe em dois pacientes e ao número geral de pessoas que apresentaram esse padrão.

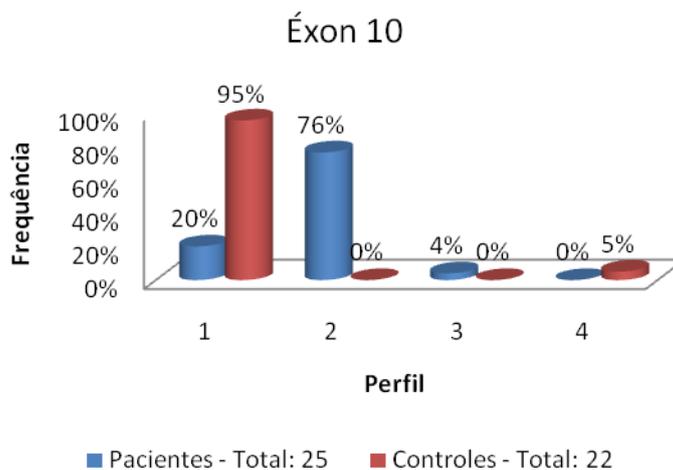


Gráfico 4: Representação da frequência dos perfis 1 ao 4 em pacientes e controles.

Por se tratar de uma frequência alta, perfil 2, a análise nos remete a um polimorfismo encontrado nos pacientes já que sua incidência é considerável alta em relação a sua presença na população paraibana.

4.7. Análise do éxon 12

Por fim, a análise do éxon 12 também revelou alterações no padrão de migração dos fragmentos (Figura 10). Foram identificados sete perfis através do rastreio populacional da Paraíba para HC que foi realizado por SSCP, aproveitando a alteração causada pelas supostas mutações, na mobilidade eletroforética.

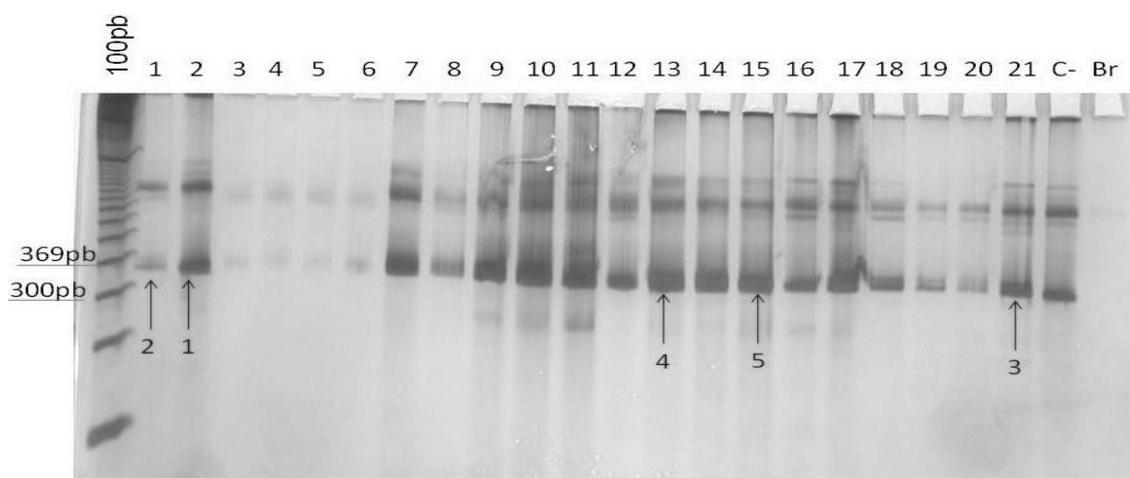


Figura 11: Gel de Poliacrilamida (desnaturante - 5% de Glicerol); Análise dos pacientes para o éxon 12; Canaleta 1 a 21 representa os pacientes; a numeração abaixo dos fragmentos seguida por setas, indica o padrão de migração diferenciado entre os demais; Controle negativo (C-); Branco (Br); Padrão (1): 1ª, 2ª, 3ª, 4ª banda; (2): 1ª, 2ª banda; (3): 1ª, 2ª, 3ª, 4ª banda + Duas abaixo da 1ª banda; (4): 2ª, 4ª banda; (5): 1ª, 2ª, 4ª banda.

De maneira semelhante ao que foi observado no éxon 09 os pacientes 13, 14 e 18 da família B apresentaram alterações comuns, porém divergindo apenas em perfis. Os dois primeiros se encontram no perfil 4 e o último no perfil 5.

Éxon 12

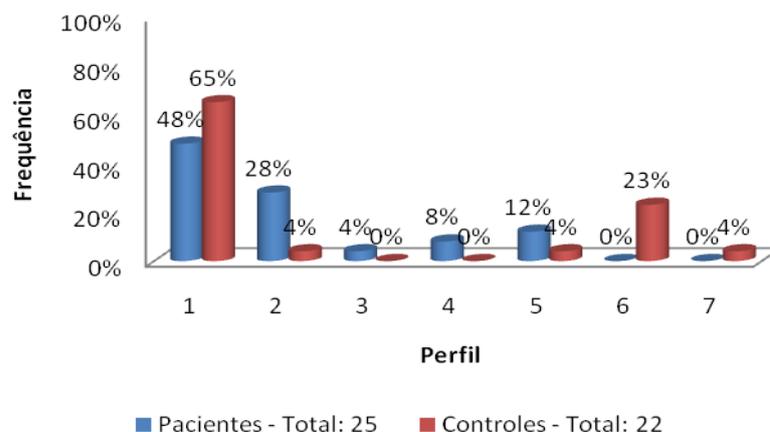


Gráfico 5: Representação da frequência do perfil 1 ao 7 em pacientes e controles.

O gráfico 5 traduz a frequência dos perfis analisados. Observamos alternância de expressão de perfis entre pacientes e controles. Os perfil 3, 4 e 5 apresentaram menor incidência, os pacientes por eles representados serão sequenciados. A tabela 2 demonstra em síntese os resultados das nossas análises.

Tabela 2 - Possíveis mutações encontradas entre 25 pacientes com HC no rastreamento molecular do gene TPO.

Éxon	Perfis Encontrados	Perfis com Prováveis Mutações	Pacientes	Frequência	Total paciente/ controle
8B	4	Perfil 8B.2	P7	5%	18/0
		Perfil 8B.3	P22	5%	
		Perfil 8B.4	P23	5%	
		Perfil 8B.5	P24	5%	
09	7	Perfil 09.2	P6, P13, P14, P15, P18	20%	25/22
		Perfil 09.3	P2, P3	8%	
		Perfil 09.4	P1	4%	
		Perfil 09.6	P16	4%	
10	4	Perfil 10.1	P14, P15, P16, P17, P18	20%	25/22
		Perfil 10.3	P10	4%	
12	7	Perfil 12.3	P21	4%	25/22
		Perfil 12.4	P13, P14	8%	
		Perfil 12.5	P15, P17, P18	12%	

5. DISCUSSÃO

Métodos de triagem na detecção de mutações continuam sendo um grande avanço para o diagnóstico molecular de muitas alterações genéticas. Dessa forma, o Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP) vem apresentando melhores resultados na rapidez, sensibilidade e simplicidade de sua reprodutividade.

A maneira como a mutação afeta a molécula de DNA, e como interfere na mobilidade eletroforética da sequência amplificada norteia a detecção das mutações. Por isso, os iniciadores da amplificação são de suma importância para formação dos heteroduplex que venham ter uma mobilidade eletroforética diferente do controle normal (JORGE, 2002).

A principal causa genética da disormonogênese são os defeitos no gene da tireoperoxidase (RUBIO *et al.*, 2002). Neste estudo, foi realizada análise de DNA genômico de 25 pacientes, acometidos pelo HC oriundos de vários municípios do estado da Paraíba, visando identificar alterações no gene TPO. Os resultados apontam para diferentes perfis de migração com mecanismos de mobilidade variados.

A atividade enzimática do TPO depende da conformação estrutural correta da proteína, da sua inserção apical e da presença do sítio ativo. Três diferentes mecanismos já foram identificados podendo interferir na atividade da enzima. Primeiramente, mutações que causam mudança no quadro da leitura (*frameshift*). Segundo, a troca de aminoácidos pode provocar importantes mudanças de conformação da proteína. Terceiro, a substituição de um aminoácido pode afetar a função da enzima sem alterar sua estrutura e localização (DELADOËY *et al.*, 2008).

Conforme verificado, grande parte dos éxons analisados nesse estudo apresentou variantes polimórficas. Porém algumas análises pacientes-controles não foram possíveis, por exemplo, o éxon 8B indivíduos controle, devido à problemas na reação da PCR. Como também problemas de expressão dos fragmentos, que foram repetidos para melhor visualização.

O rastreio de mutações no gene da TPO em doentes com HC na população paraibana demonstra heterogeneidade no padrão de mobilidade eletroforético. No presente trabalho, os éxons com maior prevalência de possíveis mutações foram o 8B, 09, 10 e 12. Entretanto, o éxon que apresentou maior número de perfis e de indivíduos afetados aparentados que compartilhavam o mesmo padrão de migração de fragmentos correspondem ao éxon 09.

À nível da localização das mutações no gene da TPO, os resultados das variadas pesquisas apontam regiões que correspondem ao centro catalítico da enzima (éxon 08, 09 e 10). As mutações já descritas na literatura, não foram caracterizadas em termos de expressão e função da proteína mutada.

Apesar da TPO ser uma enzima chave na síntese de HT, os casos de HC com defeitos no gene desta proteína, em comparação com a totalidade dos casos de HC, são considerados raros (RODRIGUES, 2004). A genotipagem dos pacientes pode ajudar no entendimento do papel das mutações no desenvolvimento desta síndrome, dessa forma a caracterização ganha importância uma vez que no futuro o número tende a aumentar.

O Polimorfismo é considerado como diferenças nos fenótipos, mudanças nas sequências de DNA, não acompanhadas de variação fenotípica, ou ainda uma variação comum na sequência de DNA entre os indivíduos. Nos éxons 06 e 07, para a população estudada, não foi identificado variantes, podendo ser considerado polimorfismo e não padrão polimórfico.

Segundo Avbelj *et al.* (2007) a mutação identificada no éxon 06 cria um sinal de terminação causando uma perda da parte catalítica da enzima. No entanto, não observamos padrões de migração diferenciado para este éxon na nossa amostra. A não divergência dos padrões eletroforéticos, para este éxon, pode ser justificada devido à localização extracelular na proteína.

A análise de SSCP em Rivolta *et al.* (2007) resultou em uma mutação *frameshift* com um códon de parada prematuro no éxon 07 na população de Buenos Aires. Em nossa análise por este mesmo método eletroforético e diferente população, o éxon 07 apresentou mesmo perfil em todos os pacientes e perfil diferente para os controles. Podendo ser considerado polimorfismo, mas não um padrão polimórfico.

No éxon 8B foi analisados cinco perfis dos quais apenas quatro (2, 3, 4 e 5) foram considerados. No éxon 09 acompanhamos a identificação de sete perfis de migração na nossa amostra, sendo quatro destes relevantes para nossa avaliação devido à importância crítica desta região totalmente ativa no gene TPO. Todos os perfis eletroforéticos alterados presentes em apenas em pacientes de baixa frequência serão verificadas por sequenciamento.

Bakker *et al.* (2000) descreve quatro grupos de mutações na população holandesa: *frameshift* (seis diferentes) ocorrem com maior frequência (39 dos 69 alelos estudados no gene TPO); mutações *missense* (seis diferentes) encontrados em 15 alelos mutados, está em segundo lugar; *splicing* (três diferentes), responsável por cinco alelos

afetados e, finalmente, uma mutação de absurdo, que afeta quatro alelos TPO. A maioria das possíveis mutações ocorrem nos éxons 08, 09 e 10 assim como as possíveis mutações de nosso estudo na população paraibana. Estes éxons codificam o sítio ativo da enzima, a parte envolvida na ligação heme.

Neves (2008) descreve uma alteração no éxon 10 que leva a substituição da arginina pela glutamina, sendo indivíduos heterozigotos para HC. Para este éxon encontramos quatro perfis alterados e apenas dois exclusivos para pacientes que foram selecionados para sequenciamento.

Na nossa pesquisa também há traços variáveis nas expressões de mobilidade dos perfis no éxon 12. Foram identificados 7 padrões, sendo o perfil 4 representado por indivíduos aparentados (13 e 14) e o perfil 5 representado pelos pacientes 15, 17 e 18, este também integrante da mesma família dos representantes do perfil 4, família B. Verificamos que os demais perfis apresentaram incidência maior que 2% no grupo controle, indicando que todos são polimorfismos.

6. CONCLUSÃO

- O SSCP provou ser um método eficiente para a triagem de possíveis mutações nos gene TPO, no entanto, a padronização é importante para a detecção das mutações.
- Verificamos um maior número de perfis variáveis, prováveis mutações associadas ao HC nos éxons 8B, 09, 10 que correspondem ao centro catalítico na enzima.
- Nos éxons 09, 10 e 12, indivíduos pertencentes as mesmas famílias compartilharam o mesmo padrão eletroforético. O que corrobora que esses perfis alterados correspondam a mutações no gene TPO.
- Com o sequenciamento dos perfis alterados rastreados por SSCP poderemos caracterizar a natureza das mutações, como também identificar polimorfismos e mutações relacionadas com HC, e dessa forma verificar a frequência dessas mutações na população paraibana.

REFERÊNCIAS

ABRAMOICZ, M. J. *et al.* Identification of a Mutation in the Coding Sequence of the Human Thyroid Peroxidase Gene Causing Congenital Goiter. **The Journal Clinical Investigation**, Argentina, v. 90, p. 1200–1204, oct. 1992.

AVBELJ, M. *et al.* High prevalence of thyroid peroxidase gene mutations in patients with thyroid dyshormonogenesis. **European Journal of Endocrinology**, v. 156, p. 511-519, 2007.

BAKKER, B. *et al.* Two Decades of Screening for Congenital Hypothyroidism in the Netherlands: TPO Gene Mutations in Total Iodide Organification Defects (an Update). **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.85, n. 10, p. 3708-3712, jul. 2000.

BIKKER, H. *et al.* Molecular Analysis of Mutated Thyroid Peroxidase Detected in Patients with Total Iodide Organification Defects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 2, p. 649-653, fev. 1997.

CAPEN, C. C. Comparative anatomy and physiology. In: BRAVERMAN, L. E.; UTIGER, R. D.; **The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text**. 8th ed. Philadelphia: Lippincott-Williams e Williams, p. 20-43, 2000.

CAVALIERI, R. R. Iodine metabolism and thyroid physiology: current concepts. **Thyroid**. v.7, n. 2, p. 177-181, apr. 1997.

DJEMLI, A. *et al.* Congenital hypothyroidism: From paracelsus to molecular diagnosis. **Clinical Biochemistry**, Canada, v. 39, p. 511– 518, apri. 2006.

DELADOËY, J. *et al.* Pseudodominant Inheritance of Goitrous Congenital Hypothyroidism Caused by TPO Mutations: Molecular and in Silico Studies. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 2, p. 627-633, fev. 2008.

FOLLEY, T. P. **Congenital hypothyroidism**. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2000.

GIBSON, J. *et al.* Analysis of frequently mutated regions of BRCA 1 by SSCP using PhastGel™ analysis and silver staining. **Science Tools from Pharmacia Biotech**. p. 2-3, 1997.

GONFINETTI, N. V. **Endocrinologia E Obesidade**. Disponível em: <<http://www.endocrinologiaeobesidade.com.br/tireoide.htm>> Acesso em: 5 jun. 2011.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 931-943.

JORGE, S. B. **Otimização da técnica de SSCP (Single Etrand Conformation Polymorphism) para triagem de mutações nos genes da Globina α Humana**. 2002.

61 p. Dissertação (Mestre em Ciências Médicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas, Campinas, 2002.

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

KONATI, T. *et al.* A novel mutation in the human thyroid peroxidase gene resulting in a total iodide organification defect. **Journal of Endocrinology**, v. 160, n. 2, p. 267–273, fev. 1999.

LAVIN, N. Manual de Endocrinologia e Metabolismo no Adulto e na Criança. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006. p. 373-444.

MARINHO, M.; FIGUEIRA, R. **Doenças da tireóide**. vol 1. São Paulo: Medklin, 2009.

MEDEIROS-NETO, G.; KNOBEL, M. **Hipotireoidismo congênito no Brasil: Desafios à busca de soluções**. São Paulo: Conectfarma Publicações, 2008.

MOLINA, A. L.; TOBO, P. R. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Revista Einstein**, v. 2, n. 2, p. 139-142, 2004. Disponível em: <<http://www.einstein.br/biblioteca/artigos/Vol2Num2/Serie%20Biologia%20parte%202.pdf>> Acesso em: 26 mai. 2011.

MONTANELLI, L. *et al.* Congenital Hypothyroidism and Late-Onset Goiter: Identification and Characterization of a Novel Mutation in the Sodium=Iodide Symporter of the Proband and Family Members. **Thyroid**, v. 19, n. 12, p. 1419-1425, dec. 2009.

MORENO, J. C. *et al.* Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (*THOX2*) and congenital hypothyroidism. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 2, p. 95-102, jul. 2002.

MORENO, J. C. *et al.* Mutations in the Iodotyrosine Deiodinase Gene and Hypothyroidism. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 17, p. 1811-1818, apr. 2008.

NEVES, S. C. **Hipotireoidismo congênito: rastreamento e identificação de mutações no gene TPO em pacientes com defeito parcial ou total de incorporação de iodeto**. 2008. 131 p. Dissertação (Mestre em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

OTITA, M. *et al.* Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. n° 86, p. 2766 – 2770, 1989.

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

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

OLIVEIRA, A. S. **Transporte de Hormônios Tiroideanos em Hemácias de Pacientes com Hipertireoidismo ou Hipotireoidismo Primário**. 2009. 104 p. Tese (Doutor em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

RIS-STALPERS, C; BIKKER, R. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to TPO mutations. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 322, p. 38-34, ago. 2010.

RODRIGUES, C. F. **Rastreio Molecular do gene da peroxidase da tiróide em doentes com hipotireoidismo congênito**. 2004. 105 p. Tese (Mestrado em Genética Molecular) - Escola de Ciências, Universidade do Minho, Braga, 2004.

RODRIGUES, C. F. *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, p. 193-198, 2005.

RUBIO, I. G. S. *et al.* A Molecular Analysis and Long-Term Follow-up of Two Siblings with Severe Congenital Hypothyroidism Carrying the IVS30+1G>T Intronic Thyroglobulin Mutation. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 8, p. 1337-1344, set. 2008.

SIMM, D. *et al.* Two novel mutations in the human thyroid peroxidase (TPO) gene: genetics and clinical findings in four children. **Acta Paediatrica**, v. 98, p. 1057–1065, jan. 2009.

TARGOVNIK, H. M. *et al.* Thyroglobulin Gene Mutations in Congenital Hypothyroidism. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 75, p. 311-321, mar. 2011.

TURKKAHRAMAN, D. *et al.* Analysis of TPO gene in Turkish children with iodide organification defect: identification of a novel mutation. **Endocrinol**, v. 37, p. 124–12, 2010.

VAISMAN, M. *et al.* Enzimas Envolvidas na Organificação Tiroideana do Iodo. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 48, n. 1, p. 9-15, fev. 2004.

VEROCHOVSKY, I. Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis, In: WALKER, J. M.; RAPLEY, R. **Medical Biomethods Handbook**. Humana Press, 2005. p. 73-77.

WAJCHENBERG, B. L. Tratado de endocrinologia clínica. 1. ed. São Paulo: Roca, 1992. p. 293-325.

WANG, Y. *et al.* Molecular characterization of thyroid peroxidase gene in porcine. **Journal of Genetics and Genomics**, n. 37, p. 381–388, may. 2010.