



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

**YANNE DE OLIVEIRA**

**ANÁLISE DE MICROSSATÉLITES LOCALIZADOS PRÓXIMO AO GENE  
RECEPTOR DO HORMÔNIO ESTIMULADOR DA TIREÓIDE (TSHR) EM  
PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO DO ESTADO DA  
PARAÍBA**

**CAMPINA GRANDE – PB**

**2016**

**YANNE DE OLIVEIRA**

**ANÁLISE DE MICROSSATÉLITES LOCALIZADOS PRÓXIMO AO GENE  
RECEPTOR DO HORMÔNIO ESTIMULADOR DA TIREÓIDE (TSHR) EM  
PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO DO ESTADO DA  
PARAÍBA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Prof.<sup>a</sup> Dra. Simone Silva dos Santos Lopes

CAMPINA GRANDE – PB

2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

O48a Oliveira, Yanne de.

Análise de microssatélites localizados próximo ao gene Receptor do Hormônio Estimulador da Tireóide (TSHR) em pacientes com hipotireoidismo congênito do estado da Paraíba [manuscrito] / Yanne de Oliveira. - 2016.

51 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.

"Orientação: Profa. Dra. Simone Silva dos Santos Lopes, Departamento de Ciências Biológicas".

1. Hipotireoidismo congênito. 2. Hormônio Estimulador da Tireoide - TSH. 3. Microssatélites. I. Título.

21. ed. CDD 616.444

**YANNE DE OLIVEIRA**

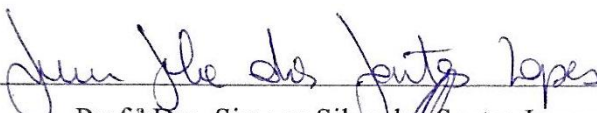
**ANÁLISE DE MICROSSATÉLITES LOCALIZADOS PRÓXIMO AO GENE  
RECEPTOR DO HORMÔNIO ESTIMULADOR DA TIREÓIDE (TSHR) EM  
PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO DO ESTADO DA  
PARAÍBA**

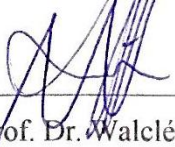
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

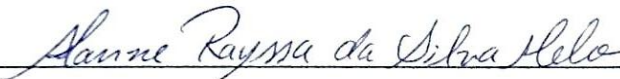
Área de concentração: Genética Humana Populacional.

Aprovado em: 20 / 10 / 2016 .

**BANCA EXAMINDORA**

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Simone Silva dos Santos Lopes (Orientadora)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Walclécio Morais Lira  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
\_\_\_\_\_  
Ma. Alanne Rayssa da Silva Melo  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

*A Deus, e aos meus queridos pais,  
que sempre me ofereceram suporte  
e amor incondicional.*

*DEDICO.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual da Paraíba pela oportunidade da realização de minha graduação no curso de Ciências Biológicas, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão do suporte financeiro para este projeto.

À professora Dra. Simone Silva dos Santos Lopes por ter me proporcionado a oportunidade da realização deste trabalho, pela orientação e pelas palavras de incentivo que foram de fundamental importância em minha formação acadêmica. Tenho pela senhora uma enorme admiração, por sua competência, inteligência e generosidade. Minha eterna gratidão.

A todos os memoráveis professores e funcionários do Departamento de Biologia, pela presteza e pelo comprometimento nas atividades que exercem, contribuindo com a formação de futuros profissionais e para o desenvolvimento da Ciência.

A banca examinadora pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho e pelas valiosas considerações feitas.

Aos pacientes e controles pela colaboração com esta pesquisa.

A nossa querida técnica do laboratório Patrícia, pela amizade, disponibilidade em resolver os problemas e pelas observações nos momentos necessários. Aos colegas do Laboratório de genética e biologia molecular (LGBM - UEPB): à Anna (que esteve comigo desde o início) e Jessica, que foram sempre pessoas maravilhosas, me oferecendo amizade e apoio; à Denise, Liliana e Hugo que estiveram também muito presentes em minha caminhada, compartilhando conhecimento e força para que nossas pesquisas fossem concluídas; e à Eliene, Micaela, Mayara, Alisson, Mayla, Nathalya e Andreza pela cooperação e amizade.

Aos meus queridos amigos e colegas de turma: Valbia, Caroline, Ahyanna, Anderson, Shirley, Andressa, Danilo, e Brenda pela amizade sincera nos momentos de felicidade e de conquistas, e pelo companheirismo nos momentos de dúvida e de desafios que aconteceram no decorrer de nossa graduação. Levarei a amizade que construímos dentro do meu coração.

Agradeço imensamente aos meus amáveis pais, Noaldo e Ana, pelo amor, dedicação, princípios ensinados, e amparo em todos os momentos. Palavras não são suficientes para expressar o quanto eu sou grata por ter pessoas tão especiais como vocês em minha vida. E aos meus irmãos Enio e Victor, pelas inúmeras vezes que vocês se dispuseram em me ajudar e pelos momentos de afeto, debate e de descontração. Amo muito todos vocês!

E acima de tudo sou grata a Deus, divino pai que por sua infinita generosidade me concedeu a experiência desta vida. Agradeço a ti Senhor por compreender minha inferioridade e por renovar a minha fé a cada amanhecer para enfrentar os desafios de minha caminhada.

## RESUMO

O Hipotireoidismo Congênito (HC) é um distúrbio endócrino definido como a deficiência ou ausência da produção de hormônios tireoidianos (HTs), doença que provoca a redução dos processos metabólicos e prejudica o neurodesenvolvimento. É o distúrbio congênito mais comum na infância, apresentando mundialmente prevalências entre 1:3000 e 1:4000. É comumente causado por defeitos no desenvolvimento da glândula tireoide (disgenesia tireoidiana) ou por erros inatos de biossíntese dos HTs (disormonogênese). O crescimento e função da glândula tireoide são controlados principalmente pelo hormônio estimulador da tireoide (TSH). A total insensibilidade ou resposta reduzida do receptor do hormônio estimulador da tireoide (TSHR) ao hormônio TSH resulta em uma glândula tireoide normal ou hipoplásica e na diminuição da síntese de HTs, quadro conhecido como resistência ao TSH. Os microssatélites D14S74 (AC)<sub>n</sub> e D14S606 (GATA)<sub>n</sub> localizam-se próximo ao gene do TSHR, e têm sido utilizados em análises por haplotipagem junto a mutações que provocam a resistência. Tais microssatélites foram eleitos para análise no presente estudo para verificar a associação entre alelos específicos e o HC. A amostra foi composta por 24 pacientes com HC por disormonogênese e 22 indivíduos saudáveis, ambos grupos provenientes da 2ª macrorregião de saúde do estado da Paraíba. Os alelos amplificados por PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (10% com glicerol) e identificados por meio da contagem direta. Observou-se um total de nove alelos para o microssatélite D14S74. A heterozigosidade média obtida para o marcador foi de 0,760, e o índice de diversidade genética foi de 0,872 (SD = 0,010), apontando a existência de uma alta diversidade genética na amostra. O alelo 19 foi o único identificado como exclusivo para população de pacientes, com frequência de 8%. Em relação ao microssatélite D14S606, foram observados sete alelos no total. A heterozigosidade média observada foi de 0,391, valor considerado baixo em comparação com as populações da Holanda (0,690) e Taiwan (0,610), porém o índice de diversidade genética obteve um valor bastante elevado - 0,847 (SD = 0,008), indicando que também há uma grande diversidade genética na amostra para este marcador. Também foi investigada a transmissão mendeliana dos microssatélites em 3 casos familiares, entretanto não foi possível correlacionar alelos específicos ao fenótipo de HC nestes grupos. A população estudada encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para ambos os locos analisados. Não foi encontrada associação entre nenhum alelo específico dos microssatélites e o fenótipo de HC nos indivíduos em estudo. Os dados obtidos das frequências alélicas referentes aos microssatélites analisados serão utilizados para compreender a dinâmica populacional destes marcadores na população paraibana e sua relação com o Hipotireoidismo Congênito.

**PALAVRAS-CHAVE:** Hipotireoidismo Congênito, TSHR, Paraíba.

## ABSTRACT

Congenital hypothyroidism (CH) is an endocrine disorder defined as the deficiency or absence of production of thyroid hormone (TH), disease that causes the reduction of metabolic processes and affects neurodevelopment. It is the most common congenital disorder in childhood, with worldwide prevalence of 1: 3000 and 1: 4000. It is commonly caused by defects in the development of the thyroid gland (thyroid dysgenesis) or inborn errors of biosynthesis of THs (dyshormonogenesis). The growth and function of the thyroid gland are mainly controlled by the thyroid stimulating hormone (TSH). The total insensitivity or reduced response of the thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) to TSH results in a thyroid gland normal or hypoplastic and decreased THs synthesis, framework known as resistance to TSH. Microsatellite D14S74 (AC)<sub>n</sub> and D14S606 (GATA)<sub>n</sub> located near the TSHR gene, and have been used in haplotyping analyzes along with mutations that lead to resistance. These microsatellites were chosen for analysis in this study to determine the association between specific alleles and CH. The sample consisted of 24 patients with CH by dyshormonogenesis and 22 healthy subjects for CH, both groups from the 2nd health macro-region of the state of Paraiba. The PCR amplified alleles were visualized by electrophoresis in denaturing polyacrylamide gel (10% with glycerol) and identified by direct counting. There was a total of nine alleles for the locus D14S74. The average heterozygosity observed for the marker was 0,760 ( $p = 0,000$ ), and genetic diversity of 0,872 ( $SD = 0,010$ ), indicating the existence of a high genetic diversity in the sample. The allele 19 was the only one identified as unique to the patient population, with frequency of 8%. Regarding the microsatellite D14S606, seven alleles were observed in total. The average observed heterozygosity was 0,391 ( $p = 0,000$ ), value considered low compared to the population of Netherlands (0,690) and Taiwan (0,610), but the genetic diversity achieved a very high value – 0,847 ( $SD = 0,008$ ) indicating that there is also a large genetic diversity in the sample for this marker. It was also investigated Mendelian transmission of microsatellites in 3 familial cases, but it was not possible to correlate the specific alleles with CH phenotype in these groups. The study population is in Hardy-Weinberg equilibrium for two loci analyzed. There was no association between any specific allele of the microsatellite and the CH phenotype in individuals under study. The data of allelic frequencies related to the analyzed microsatellites will be used to understand the population dynamics of these markers in Paraiba population and its relationship with Congenital Hypothyroidism.

**KEYWORDS:** Congenital Hypothyroidism, TSHR, Paraiba.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Síntese de hormônios tireoidianos .....	18
<b>Figura 2</b> - Modelo do Receptor do TSH em 3D .....	19
<b>Figura 3</b> - Mapa geográfico do estado da Paraíba .....	25
<b>Figura 4</b> - Cromatograma do microssatélite D14S74 - Paciente nº 21 .....	28
<b>Figura 5</b> - Cromatograma do microssatélite D14S606 - Paciente nº 3 .....	28
<b>Figura 6</b> - Gel de poliacrilamida (12%) desnaturante do microssatélite D14S74 .....	29
<b>Figura 7</b> - Distribuição das frequências alélicas totais - D14S74.....	30
<b>Figura 8</b> - Distribuição das frequências em pacientes e controles - D14S74 .....	30
<b>Figura 9</b> - Distribuição das frequências genótípicas totais - D14S74 .....	31
<b>Figura 10</b> - Distribuição das frequências genótípicas em pacientes e controles - D14S74....	31
<b>Figura 11</b> - Gel de poliacrilamida (10%) do microssatélite D14S606 .....	32
<b>Figura 12</b> - Distribuição das frequências alélicas totais - D14S606.....	33
<b>Figura 13</b> - Distribuição das frequências alélicas em pacientes e controles - D14S606 .....	33
<b>Figura 14</b> - Distribuição das frequências genótípicas totais - D14S606 .....	34
<b>Figura 15</b> - Distribuição das frequências genótípicas em pacientes e controles - D14S606..	34
<b>Figura 16</b> - Heredograma da família 1 com os genótipos dos pacientes 1, 4 e 7 .....	35
<b>Figura 17</b> - Heredograma da família 2 com os genótipos dos pacientes 6, 13, 14 e 18 .....	36
<b>Figura 18</b> - Heredograma da família 3 com os genótipos dos pacientes 5 e 12 .....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Classificação e etiologia do Hipotireoidismo Congênito .....	16
<b>Tabela 2</b> - Oligonucleotídeos iniciadores dos microssatélites D14S74 e D14S606.....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CREB	Fator de ligação ao elemento de resposta AMPc
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DEHAL1	Iodotirosina desalogenase 1
DUOX2	<i>Dual oxidase</i>
DIT	Diiodotirosina
DT	Disgenesia tireoidiana
He	Heterozigosidade esperada
Ho	Heterozigosidade observada
HC	Hipotireoidismo Congênito
HT	Hormônio tireoidiano
HUAC	Hospital Universitário Alcides Carneiro
MIT	Monoiodotirosina
NIS	Simportador sódio/iodo
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PAX8	<i>Paired box transcription factor-8</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PDS	Pendrina
TPO	Tireoperoxidase
TG	Tireoglobulina
TSHR	Receptor do Hormônio Estimulador da Tireoide
TSH	Hormônio Estimulador da Tireoide
TTF1	Fator de transcrição tireoidiano 1
TTF2	Fator de transcrição tireoidiano 2
T <sub>3</sub>	Triiodotironina
T <sub>4</sub>	Tetraiodotironina ou tiroxina
STR	<i>Short tandem repeat</i>
SNC	Sistema nervoso central
TRH	Tireotropina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>14</b>
2.1 Hipotireoidismo Congênito .....	14
2.2 Classificação do HC .....	15
2.3 Bases moleculares do HC primário .....	17
2.4 Receptor do Hormônio Estimulador da Tireoide (TSHR) .....	18
2.4.1 Resistência do Receptor do Hormônio Estimulador da Tireoide (TSHR) .....	20
2.5 Microssatélites D14S74 e D14S606 .....	21
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
3.1 Objetivo geral .....	24
3.2 Objetivos específicos .....	24
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
4.1 Tipo de estudo e amostragem .....	25
4.2 Local do estudo .....	26
4.3 Genotipagem das amostras .....	26
4.3.1 Extração de DNA .....	26
4.3.2 Reação em Cadeia de Polimerase e Eletroforese .....	26
4.4 Análise estatística .....	27
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
5.1 Sequenciamento de amostras para obtenção de marcadores internos .....	28
5.2 Microssatélite D14S74 .....	29
5.3 Microssatélite D14S606 .....	32
5.4 Segregação mendeliana em casos familiares .....	35
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>42</b>
<b>APÊNDICE A - Sequenciamento Direto .....</b>	<b>49</b>
<b>APÊNDICE B - Dados gerais do microssatélite D14S74 .....</b>	<b>50</b>
<b>APÊNDICE C – Dados gerais do microssatélite D14S606 .....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Hipotireoidismo Congênito (HC) caracteriza-se por uma doença que decorre da incapacidade na produção de quantidades suficientes de hormônios tireoidianos (HTs) presente desde o nascimento. Quando o diagnóstico e o tratamento não são estabelecidos de maneira precoce o HC pode provocar graves e irreversíveis anormalidades neurológicas, no sistema motor e no desenvolvimento do organismo (GRUTERS, 1996; TARGOVNIK *et al.*, 2011). É considerado o distúrbio congênito do sistema endócrino mais comum, apresentando mundialmente prevalências entre 1:3000 e 1:4000 nascidos vivos (GRASBERGER; REFETOFF, 2011) e no Brasil valores entre 1:2595 e 1:4795 (MACIEL *et al.*, 2013).

Defeitos durante o desenvolvimento da glândula tireoide são responsáveis por 85% dos casos de HC, condição conhecida por disgenesia tireoidiana. O HC também pode resultar de erros durante a síntese de HTs, quadro denominado disormonogênese, que representa de 10 a 15% dos casos (VONO-TONIOLO; KOPP, 2004). A maioria dos casos de HC são esporádicos, no entanto diversos mecanismos moleculares têm sido identificados e associados a fisiopatologia da glândula (BEARDSALL; OGILVY-STUART, 2004).

Dentre os vários fatores etiológicos responsáveis pelo surgimento do HC encontram-se as mutações inativadoras no gene do Receptor do Hormônio Estimulador da Tireoide (TSHR) e as mutações nos elementos de transdução de sinais do receptor, que provocam o quadro de resistência ao TSH, definida como a resposta reduzida ou ausente da glândula tireoide ao hormônio TSH, principal regulador do crescimento, diferenciação e função das células foliculares da tireoide (GRASBERGER *et al.*, 2005; PASCHKE; LUDGATE, 1997). A insensibilidade do receptor ao hormônio TSH resulta em um fenótipo caracterizado por elevados níveis de TSH sérico associados a níveis normais ou reduzidos de HTs, e a presença da glândula tireoidiana normal ou hipoplásica (TOSANO *et al.*, 1999).

Os microssatélites D14S74 e D14S606 são marcadores moleculares de padrão polimórfico que estão localizados a cerca de 6,54 Mb ou 5,3 cM (Mapa genético de Marshfield) em torno do gene do receptor do TSH (SRIPHRAPRADANG *et al.*, 2012). Estes microssatélites vêm sendo utilizados nos últimos anos em análises por haplotipagem junto a mutações no gene do receptor do TSH, como demonstrado em estudos realizados com famílias de origem árabe onde foram encontrados haplótipos específicos que contemplavam tais marcadores e mutações que acarretam o fenótipo de resistência ao TSH (GRASBERGER *et al.*, 2007; TENENBAUM-RAKOVER *et al.*, 2009; SRIPHRAPRADANG *et al.*, 2012).

Devido ao fato do Hipotireoidismo Congênito ser uma doença que apresenta considerável prevalência na população brasileira, torna-se relevante a investigação acerca da sua etiologia através da triagem e caracterização molecular. Diante deste contexto, o presente estudo teve como propósito analisar as frequências alélicas dos microssatélites D14S74 e D14S606 em pacientes com o diagnóstico confirmado para o HC e em controles do estado da Paraíba (2ª Macrorregião de saúde), verificando a possível existência de alelos específicos presentes em indivíduos afetados pela disfunção, e comparando com valores encontrados em outras populações a fim de proporcionar o entendimento sobre a associação dos microssatélites ao fenótipo do Hipotireoidismo Congênito.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Hipotireoidismo Congênito

Por desempenharem importante função no metabolismo intermediário de praticamente todos os tecidos do organismo, os hormônios tireoidianos (HTs) - triiodotironina ( $T_3$ ) e tetraiodotironina ( $T_4$ ) - são moléculas essenciais para o normal crescimento e desenvolvimento, e para promoção da homeostase metabólica (DE LA VIEJA *et al.*, 2000; GILLAM; KOPP, 2001a). São essenciais durante a vida fetal e no neonato para o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), e a ausência dos mesmos provoca a imaturidade deste tecido, a hipoplasia dos neurônios corticais, atraso da mielinização e a redução da vascularização (SETIAN, 2007).

Devido a importância atribuída a tais hormônios, graves sequelas no desenvolvimento neurológico e intelectual podem decorrer da ausência ou deficiência dos mesmos, o que caracteriza o distúrbio do Hipotireoidismo Congênito (HC), definido como a deficiência na síntese de hormônios tireoidianos presente desde o nascimento, comumente causada por problemas no desenvolvimento da glândula tireoide (disgenesia) ou por distúrbios na biossíntese dos hormônios tireoidianos (disormonogênese). Este quadro pode ser evitado com a adoção de ações como o diagnóstico através da triagem neonatal e o tratamento precoce do indivíduo afetado (PARK *et al.*, 2004; RASTOGI; LAFRANCHI, 2010). Quando realizados desde as primeiras semanas de vida estes procedimentos contribuem também para diminuição do risco de atraso no crescimento e no desenvolvimento fisiológico (CHEN *et al.*, 2013), evitando problemas como o desenvolvimento incompleto do sistema esquelético, macroglossia, hipotonia, mixedema, distensão abdominal, septo nasal incompleto, hipotermia e hérnia umbilical (WEBER *et al.*, 2000).

A maioria dos países desenvolvidos já introduziu programas de triagem neonatal para o diagnóstico do HC, e quase todos os indivíduos são diagnosticados em sua primeira infância. Estas circunstâncias foram fornecendo oportunidades para vários tipos de investigações epidemiológicas sobre o HC (NARUMI *et al.*, 2009). No Brasil o Ministério da Saúde implantou desde o ano 2001 o Programa Nacional de Triagem Neonatal (Portaria nº 822/2001) (RAMALHO, *et al.*, 2008), teste que também contempla o diagnóstico do HC, através da determinação de concentrações de TSH (Hormônio Estimulador da Tireoide) em filtro de papel, seguido da mensuração de  $T_4$  total e/ou de  $T_4$  livre no soro quando necessário (MACIEL *et al.*, 2013). Com a confirmação do diagnóstico a terapia reposição hormonal é

iniciada entre as 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> semanas de idade e realizada em geral com o hormônio sintético L-tiroxina (CORBETTA *et al.*, 2009).

Outros testes de diagnóstico como a captação tireoidiana radionuclídeo, ultrassonografia da tireoide, determinação de níveis de séricos de Tireoglobulina (TG), detecção de anticorpos antitireoidianos, determinação dos níveis de iodo urinário, e a triagem molecular para detecção de mutações genéticas podem ajudar no reconhecimento da etiologia do distúrbio, embora o tratamento da doença possa ser iniciado anteriormente a realização dos mesmos (RASTOGI; LAFRANCHI, 2010).

Além destas ações, também deve ser garantido o aconselhamento genético aos pacientes diagnosticados com HC permanente e seus familiares para evitar a ocorrência de novas gestações com indivíduos afetados pela doença (JORDAN *et al.*, 2003).

O HC representa o distúrbio congênito do sistema endócrino mais comum e constitui uma das maiores causas do retardo mental considerado evitável, apresentando mundialmente prevalências de 1:3000 a 1:4000 nascidos vivos (GRASBERGER; REFETTOFF, 2011). No Brasil o HC apresenta valores semelhantes para prevalência, variando entre 1:2595 e 1:4795 nascidos vivos (MACIEL *et al.*, 2013).

Em um estudo realizado em Atlanta (EUA) por Roberts *et al.* (1997) foi demonstrado que o HC primário (associado a defeitos no desenvolvimento e funcionamento da glândula tireoide) era mais frequente entre os indivíduos brancos não-hispânicos (1:4400 nascidos vivos) que entre os indivíduos negros (1:10000 nascidos vivos), e mais frequente entre as mulheres (1:4000 nascidos vivos) que entre os homens (1:7700 nascidos vivos). Pessoas portadoras da síndrome de Down também demonstraram um risco 35 vezes maior de apresentar o HC em relação à população geral.

## **2.2 Classificação do HC**

De acordo com Rastogi; Lafranchi (2010) o Hipotireoidismo Congênito é classificado em: Hipotireoidismo permanente que é a deficiência persistente da síntese de hormônios da tireoide que torna necessários tratamentos ao longo da vida, que pode ser primário ou secundário (HC associado a defeitos no eixo hipotálamo-hipófise); Hipotireoidismo transitório que é a deficiência temporária da síntese de HTs diagnosticada após o nascimento, porém com recuperação posterior do paciente pela retomada da produção de tais hormônios; Hipotireoidismo sindrômico, forma de HC associada a diversas síndromes; ou ainda em



Hipotireoidismo periférico que é relacionado a defeitos no transporte, metabolismo e resistência à ação dos hormônios da tireoide no organismo (Tabela 1).

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

1. Hipotireoidismo primário:

- Disgenesia da tireóide: hipotireoidismo devido a uma anomalia no desenvolvimento (Ectopia da tireóide, agenesia, hipoplasia, hemiagenesia). Mutações associadas: TTF-2, TTF1 e PAX 8;
- Disormonogênese da tireóide: hipotireoidismo devido à produção hormonal prejudicada. Mutações associadas: defeito do simportador iodeto-sódio, defeitos da Peroxidase, defeitos de geração de peróxido de hidrogênio (DUOX2, DUOX2), defeito da Pendrina (síndrome de Pendred), defeito da tireoglobulina, defeito na deiodinase iodotirosina (DEHAL1 SECISBP2);
- Resistência a ligação ou sinalização do TSH. Mutações associadas: defeito no receptor do TSH;
- Mutação da Proteína G: pseudohipoparatiroidismo tipo 1<sup>a</sup>.

2. Hipotireoidismo secundário (sin. hipotireoidismo central):

- Deficiência isolada de TSH (mutação no gene na subunidade  $\beta$  do TSH);
- Deficiência do hormônio liberador da tireotropina - TRH. Isolada, a síndrome de interrupção da haste hipofisária (EIPS), lesão no hipotálamo;
- Resistência ao hormônio liberador da tireotropina. 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;

3. Hipotireoidismo periférico:

- Resistência ao hormônio tireoideano. Mutação no receptor  $\beta$  do hormônio tireoideano;
- Anormalidades no transporte do hormônio tireoideano;
- Síndrome Allan-Herndon-Dudley (mutação no transportador monocarboxilase 8).

4. Hipotireoidismo sindrômico:

- Síndrome Pendred (surdez hipotireoidismo - bócio) mutação na Pendrina;
- Síndrome de Bamforth-Lazarus (hipotireoidismo - fenda palatina - cabelos espetados) mutação no TTF-2;
- Síndrome Kocher-Deber-Semilange - (pseudohipertrofia muscular - hipotireoidismo);
- Coreia Benigna – hipotireoidismo;
- Choreoathetosis - (hipotireoidismo - dificuldade respiratória neonatal) mutação NKX2.1/TTF-1;
- Obesidade - colite - (hipotireoidismo - hipertrofia cardíaca - atraso no desenvolvimento).

5. 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; LAFRANCHI, 2010.

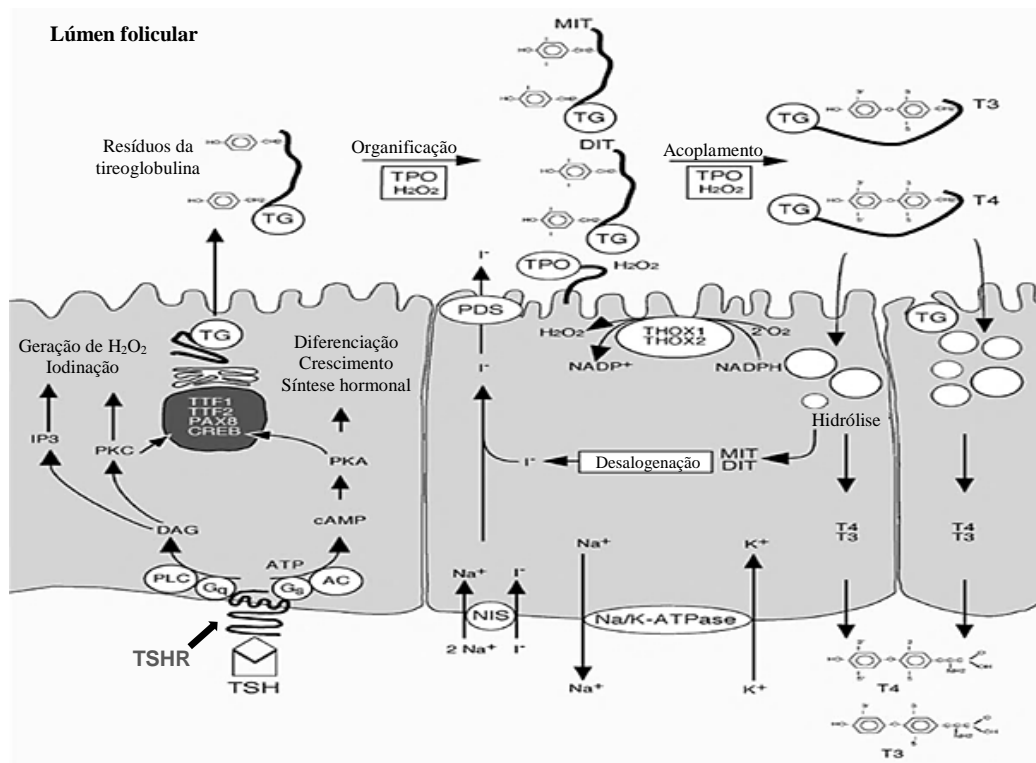
### 2.3 Bases moleculares do HC primário

Para a glândula tireoide realizar a atividade de síntese dos HTs são necessários o desenvolvimento normal das estruturas e dos mecanismos funcionais do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, o funcionamento correto do sistema de síntese de hormônios e a adequada ingestão de iodo (GILLAM; KOPP, 2001b).

Cerca de 85% dos casos de HC primário decorrem de defeitos no desenvolvimento da glândula tireoide, quadro clínico identificado como disgenesia tiroidiana (DT) (KLETT, 1997), que inclui a agenesia (ausência de tecido tireóideo detectável) ocorrendo em 25% a 35% dos casos, a ectopia (tecido tireóideo encontrado desde a base da língua até o mediastino) em 40% a 60% dos casos, e a hipoplasia (glândula em região cervical normal com tamanho reduzido) em 5% dos casos (KNOBEL *et al.*, 2001). A DT geralmente ocorre de modo esporádico, porém casos familiares de HC por disgenesia foram reportados em uma porcentagem de 2%, fundamentando a possibilidade da existência de componentes genéticos envolvidos (CASTANET *et al.*, 2000). Existe certa correlação entre o fenótipo de DT e mutações nos genes do Receptor do Hormônio Estimulador da Tireoide (TSHR) e dos fatores de transcrição TTF1, TTF2 e PAX8 que regulam a expressão de genes promotores da organogênese da glândula tireoide e de genes como a Tireoglobulina (TG), Tireoperoxidase (TPO) e do próprio Receptor do TSH (TSHR) (DE FELICE; DI LAURO, 2004; JORDAN *et al.*, 2003; KAMBE; SEO, 1997).

O HC primário também pode estar associado a erros inatos do metabolismo que ocorrem durante as etapas de biossíntese dos HTs (Figura 1), caracterizando a disormonogênese, condição que ocorre em 10% a 15% dos casos de HC (VONO-TONIOLO; KOPP, 2004). Tal prevalência pode se tornar maior em grupos étnicos com paridade elevada, alto número de casamentos consanguíneos, e em gêmeos ou indivíduos aparentados (KNOBEL *et al.*, 2001). Mutações que ocasionam a disormonogênese estão presentes nos genes: da NIS (SLC5A5), simportador do sódio e iodeto; gene do PDS (Pendrina), proteína de transporte do iodeto na membrana apical das células foliculares tireoidianas; TG (Tireoglobulina), que fornece grupos de tirosina para formação de iodotirosinas MIT e DIT; do TPO (Tireoperoxidase), enzima que realiza a organificação do iodeto e conjugação de iodotirosinas para formação dos HTs T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>; DEHAL1, enzima que realiza a reciclagem do iodeto; e os genes DUOX2 e DUOXA2, sistema que gera o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), acceptor final de elétrons requerido pela TPO (CANGUL *et al.*, 2013). A disormonogênese é geralmente associada à presença do bócio no paciente afetado (PERONE *et al.*, 2004).

**Figura 1** – Síntese de hormônios tireoidianos.



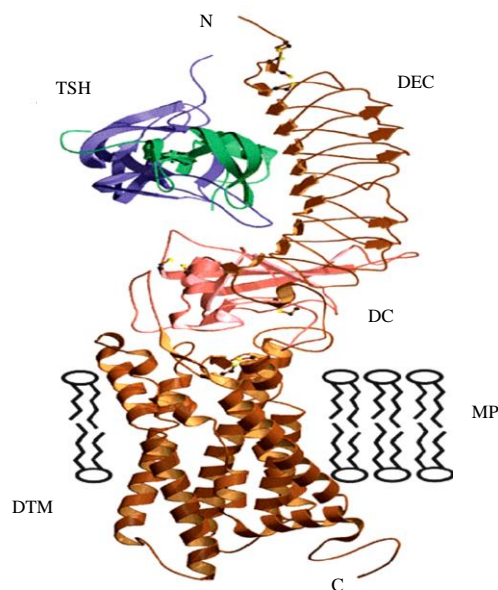
Adaptado de: VONO-TONIOLO; KOPP, 2004. O TSH se liga e ativa o Receptor do TSH, provocando a estimulação da via do AMPc e promovendo o crescimento e a diferenciação das células foliculares, além da ativação da síntese de HTs. O TSHR também pode ativar a via PLC. O Iodeto ( $I^-$ ) é transportado ativamente pelo simportador NIS na membrana basolateral para dentro das células foliculares da tireoide. Na membrana apical a pendrina (PDS) medeia fluxo do iodeto para o lúmen folicular. A Tireoperoxidase (TPO) oxida os iodetos e realiza a ligação dos mesmos aos resíduos de tirosina da Tireoglobulina (TG) na presença do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) para formação das iodotirosinas MIT e DIT (organificação). O MIT e o DIT são acoplados formando os HTs  $T_4$  e  $T_3$  numa reação também catalisada pelo TPO (acoplamento). Ocorre então a invaginação destes para dentro da célula folicular para que ocorra a hidrólise do TG nos lisossomos e o  $T_3$  e o  $T_4$  sejam difundidos na circulação sanguínea.

## 2.4 Receptor do Hormônio Estimulador da Tireoide (TSHR)

O Hormônio Estimulador da Tireoide (TSH) é uma glicoproteína de 28 a 30 kDa sintetizada e segregada a partir de tireotrófos da porção anterior da glândula hipófise, que apresenta importância fundamental no desenvolvimento e controle das atividades da glândula tireoide, com seu efeito sendo mediado através de sua ligação ao domínio extracelular de um receptor específico acoplado à proteína G, o Receptor do Hormônio Estimulador da Tireoide - TSHR - (OMIM #603372) (VUISSOZ *et al.*, 2001; GRASBERGER *et al.*, 2005). Em conjunto com os receptores do Hormônio Luteinizante, da Gonadotrofina Coriônica e do Hormônio Folículo Estimulante, o TSHR pertence a sub-família de receptores associados à proteína G (CLIFTON-BLIGH *et al.*, 1997).

Tal receptor é caracterizado como uma estrutura proteica presente na membrana basolateral das células foliculares tireoidianas, apresentando sete segmentos transmembranares, três alças extracelulares e três alças intracelulares, uma extremidade aminoterminal extracelular e uma extremidade carboxiterminal intracitoplasmática (Figura 2) (STRADER *et al.*, 1994; DE LA VIEJA *et al.*, 2000). A longa porção extracelular do receptor é constituída por um mosaico de aminoácidos que inclui uma sucessão de repetições ricas em leucina, com especificidade de ligação para o hormônio TSH (GROSS *et al.*, 1991).

**Figura 2** – Modelo do Receptor do TSH em 3D.



Adaptado de: DAVIES *et al.*, 2010. Este modelo mostra os sete domínios transmembranares e o grande domínio extracelular. O domínio extracelular é constituído por 10 repetições ricas em leucina no ectodomínio, que é o principal sítio de TSH ligação, e por 50 aminoácidos na região de clivagem. Reproduzido com a permissão de Rees Smith *et al.* [www.hotthyroidology.com/editorial\\_175.html](http://www.hotthyroidology.com/editorial_175.html). DEC - Domínio extracelular; DC - domínio de clivagem; DTM - domínio transmembranar; MP – Membrana plasmática.

Nos representantes da espécie humana o gene responsável pela síntese do TSHR está localizado no cromossomo 14 - (14q31.1) -, se estendendo por mais de 60 kb e abrangendo um total de 10 éxons que codificam uma proteína com 764 aminoácidos, unidades que compõem a estrutura do receptor. Os nove primeiros éxons codificam a maior parte do domínio extracelular, e o éxon 10 codifica parte do domínio extracelular, o domínio transmembranar e toda a porção intracelular (ROUSSEAU-MERCK *et al.*, 1990; GROSS *et al.*, 1991; MISRAH *et al.*, 1990).

Após a ligação do TSH ao seu receptor é dado início ao estímulo das vias de sinalização intermediadas pelas proteínas G $\alpha$  e G $\alpha$  a ele associadas (Figura 1) (KIMURA, 2008). As duas vias estimuladas são: a via proteína Gs -/- AMPc (Adenosina Monofosfato

cíclica) que estimula a secreção dos hormônios, o crescimento e diferenciação de células da tireoide, e a captação do iodeto; e a via Gq  $\rightarrow$  IP  $\rightarrow$  Ca<sup>2+</sup> que regula a síntese de hormônios da tireoide por meio da estimulação da organificação do iodeto (VASSART; DUMONT, 1992). Devido a cascata do AMPc ter um papel central na função e proliferação das células da glândula tireoide, acredita-se que a interrupção ou estimulação inapropriada da cascata tenha o potencial de provocar diversos distúrbios tireoidianos (CORVILAIN *et al.*, 2001).

#### 2.4.1 Resistência do Receptor do Hormônio Estimulador da Tireoide (TSHR)

Mutações de perda de função no gene do receptor do TSH ou no gene da proteína G (mensageiro secundário) são responsáveis por provocar o quadro de resistência da glândula tireoide ao hormônio TSH (OMIM#275200) (SUNTHORNTHEPVARAKUL *et al.*, 1995). A inativação observada no gene do TSHR mutante pode resultar na redução da quantidade de receptores na membrana devido à diminuição da síntese ou aumento da degradação, na falha de segmentação para membrana, na redução da afinidade de ligação ao hormônio TSH (TONACCHERA *et al.*, 2004), ou ainda na incapacidade total dos receptores por serem ativados e agirem sobre as proteínas do tipo G (PERSANI *et al.*, 2010).

A insensibilidade do receptor ao hormônio TSH ocorre ao nível das células foliculares, resultando em um fenótipo caracterizado por elevados níveis de TSH sérico, associados a níveis normais ou reduzidos de HTs e a presença da glândula tireoide em tamanho normal ou hipoplásica (KOPP, 2002; TIOSANO *et al.*, 1999).

Indivíduos homozigotos ou heterozigotos compostos para mutações no TSHR podem apresentar o Hipotireoidismo compensado (ou subclínico) onde ocorre apenas uma discreta elevação na concentração de TSH sérico e a glândula tireoide é normal ou ligeiramente aumentada, ou Hipotireoidismo que pode ser leve, moderado ou grave. Alguns indivíduos heterozigotos também podem manifestar apenas níveis elevados de TSH sérico. Tais variações dependem do grau de deficiência funcional promovida pela mutação no gene do TSHR (SRIPHRAPRADANG *et al.*, 2012; KOPP, 2001).

A correlação genótipo-fenótipo é verificada em termos de quantidade de TSH no organismo, mas esta é complicada pela variabilidade de sinais clínicos. Esta variabilidade de sinais também é observada em diferentes pacientes que apresentam o mesmo tipo de mutação, destacando-se a necessidade de avaliar a correlação genótipo-fenótipo em cada caso (NICOLETTI *et al.*, 2009). A exemplo disto observa-se a mutação p.P162A, relatada em diferentes famílias com indivíduos homozigotos que, por vezes não apresentavam resistência

completa ao TSH, e indivíduos heterozigotos com uma grande variabilidade nos níveis de TSH séricos e na frequência de hipoplasia da glândula tireóide (CASSIO *et al.*, 2013).

Também é importante destacar que fenótipos morfológicos e bioquímicos semelhantes aos apresentados por pacientes com mutações inativadoras no gene do TSHR podem ocorrer em pacientes com mutações no gene PAX8, fato que ilustra as limitações de critérios morfológicos, sendo necessária a análise molecular de cada paciente para encontrar a etiologia correta da doença (VONO-TONIOLO; KOPP, 2004).

Mutações com herança autossômica recessiva no gene TSHR humano foram relatadas pela primeira vez em um estudo envolvendo um caso familiar com indivíduos heterozigotos compostos que apresentavam o quadro de resistência ao TSH (SUNTHORNTHEPVARAKUL *et al.*, 1995). Até o presente momento mais de 60 mutações foram descritas em associação com diferentes graus de resistência ao TSH (CASSIO *et al.*, 2013). Mutações com perda de sentido (*missense*), mutações sem sentido (*nonsense*), deleções e inserções (*frameshift*), ou alterações nos limites íntron-éxon (que conduzem a erros de *splicing* e *exon skipping*) foram identificadas como causadoras de alterações ao longo da estrutura do receptor, com exceção da extremidade carboxiterminal intracitoplasmática (PERSANI *et al.*, 2010).

Embora consideradas raras, foi demonstrado na população japonesa uma prevalência de 4,3% para mutações bialélicas no gene do TSHR entre os pacientes com quadros de HC de moderado a grave, e de 9,4% para mutações monoalélicas entre os pacientes com HC leve (NARUMI *et al.*, 2009).

A resistência provocada por mutações na subunidade  $\alpha$  da Gs denominado Pseudohipoparatiroidismo tipo 1a resulta em defeitos de sinalização do TSH (RASTOGI; LAFRANCHI, 2010). Além das funções clínicas e bioquímicas associadas à resistência ao hormônio, os pacientes mutados apresentam anormalidades como baixa estatura, braquidactilia e calcificações ectópicas (osteodistrofia hereditária de Al-Bright) (KOPP, 2002).

## **2.5 Microssatélites D14S74 e D14S606**

Os microssatélites (*Short Tandem Repeats- STRs*) são sequências de nucleotídeos com repetições em *tandem* de 1 a 6 pares de base de comprimento que ocorrem, em média, a cada 6-10 kb dentro do genoma. Podem apresentar um elevado grau de polimorfismo de comprimento, variando o número de unidades repetitivas exibidas (KIMPTON *et al.*, 1993).

São considerados marcadores moleculares eficazes devido à sua abundância, codominância, distribuição por todo o genoma, multi-variação alélica, elevada reprodutibilidade e elevado nível de polimorfismo. Possuem aplicações na detecção de alelos associados a doenças, no mapeamento do genoma, estudos de associação, diversidade genética, avaliação de paternidade, medicina forense, e em inferências sobre a história das populações (DURAN *et al.*, 2009).

A análise de associação de marcadores moleculares como os microssatélites com a susceptibilidade a doenças normalmente é desenvolvida em estudos do tipo caso-controle, onde as frequências alélicas ou genótípicas do local de interesse são comparadas entre as duas populações sobre investigação. Frequências elevadas dentro do grupo de indivíduos afetados são apontadas como evidências de que determinados alelos ou genótipos estejam associados ao aumento do risco da doença. Projetos de base familiar também podem ser utilizados para este tipo de estudo (HIRSCHHORN *et al.*, 2002). As explicações propostas para o fenômeno de associação são a existência de múltiplos genes interagindo (epistasia) ou do loco responsável pela doença em desequilíbrio de ligação com o loco do marcador (GREENBERG, 1993).

Os microssatélites D14S74 e D14S606 analisados no presente estudo são marcadores moleculares de padrão polimórfico localizados a cerca de 6,54Mb ou 5,3cM (Mapa genético de Marshfield) em torno do gene do Receptor do TSH (SRIPHRAPRADANG *et al.*, 2012), mais precisamente nas posições 77.72Mb (D14S74) e 81.32Mb (D14S606) do braço longo do cromossomo 14 (GRASBERGER *et al.*, 2005).

O microssatélite D14S74 descrito por Weissenbach, J. *et al.*, (1992) é caracterizado como um dinucleotídeo constituído por repetições  $AC_n$ , com fragmentos variando no intervalo de 291-317pb de comprimento e contando com um total de 11 diferentes alelos descritos (JOU *et al.*, 2005a). Em relação ao D14S606, tal microssatélite foi descrito por Murray, J. *et al.* (1997) e é caracterizado como um tetranucleotídeo contendo  $GATA_n$  como unidade de repetição. O tamanho dos fragmentos descritos variam entre 254-286pb, tendo sido encontrados ao todo 9 diferentes alelos (KIDD, 2014).

Tais marcadores moleculares foram empregados para análise por haplotipagem em um estudo realizado com cinco famílias originárias de países como França, Israel, Estados Unidos e Canadá que possuíam membros afetados pela resistência ao TSH, e os haplótipos inferidos foram discordantes para a ligação com o quadro clínico (GRASBERGER *et al.*, 2005). Também foram utilizados por Sriphrapradang *et al.* (2012), Tenenbaum-rakover *et al.* (2009) e Grasberger *et al.* (2007) para análises de haplotipagem com o objetivo de auxiliar na

investigação do fenótipo de resistência ao TSH em famílias de origem árabe, tendo sido demonstrada a associação de haplótipos específicos a mutações no gene do receptor do TSH.

Além de estudos relacionados ao HC, os microssatélites D14S74 e D14S606 também foram selecionados para triagem de perfis genéticos associados à susceptibilidade de diferentes doenças como malária, ossificação do ligamento longitudinal posterior da coluna, diabetes mellitus tipo 2 e aneurisma intracraniano (FERREIRA, 2008; FURUSHIMA *et al.*, 2002; TILBURG *et al.*, 2003; ONDA *et al.*, 2001) e para análise da diversidade genética de microssatélites (MAALEJ *et al.*, 2004).



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Verificar a existência da associação entre alelos específicos dos microssatélites D14S74 e D14S606 localizados próximo ao gene do receptor do Hormônio Estimulador da Tireoide (TSHR) e o fenótipo de Hipotireoidismo Congênito em pacientes com diagnóstico de HC do estado da Paraíba.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Amplificar os microssatélites D14S74 e D14S606 de pacientes e controles através da técnica de PCR;
- Analisar as frequências alélicas e genotípicas dos microssatélites;
- Comparar o padrão e a frequência dos alelos com dados obtidos em outras populações;
- Verificar se a população em estudo encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Tipo de estudo e amostragem

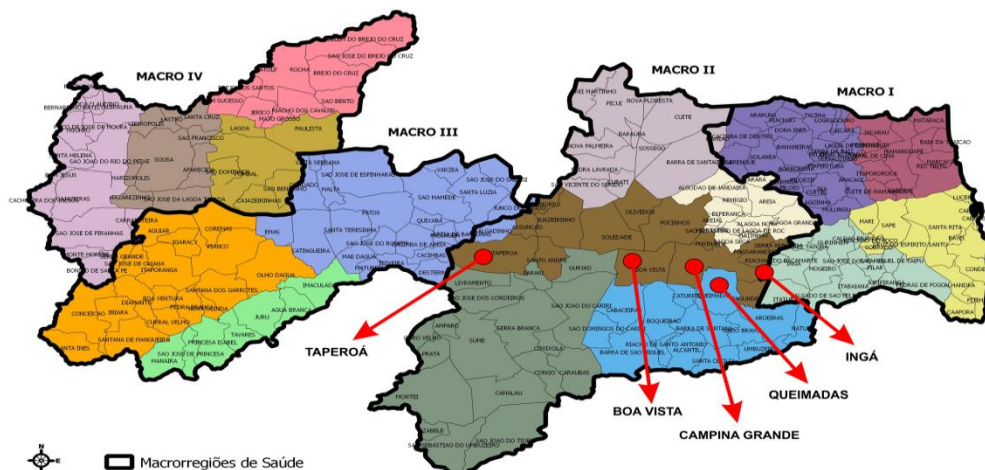
No presente estudo foram analisadas amostras de DNA extraídas a partir do sangue coletado de 24 pacientes (casos familiares e esporádicos) com diagnóstico clínico-laboratorial confirmado para Hipotireoidismo Congênito e de 22 indivíduos saudáveis, caracterizando um estudo do tipo caso-controle.

Os indivíduos afetados por HC selecionados para a pesquisa são assistidos pelos serviços do setor de endocrinologia do Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC/UFCG). Os resultados dos exames clínicos realizados com tais indivíduos mostraram um perfil de pacientes com indicativo de HC por disormonogênese, apresentando em sua grande maioria a glândula tireoide com posição e desenvolvimento normais, e em alguns casos a presença do bócio. Em relação ao grupo controle, este foi composto por pessoas não acometidas pela disfunção, pareados em idade e gênero com os indivíduos do grupo de pacientes e que não possuíam ligação genealógica entre si.

Os componentes da amostra são provenientes dos municípios de Campina Grande, Ingá, Taperoá, Queimadas e Boa Vista, localidades pertencentes a 2ª Macrorregião de Saúde do estado da Paraíba (Figura 3).

Todos os participantes ou responsáveis legais assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para a autorização da utilização das amostras de sangue, e o estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Campina Grande.

**Figura 3** – Mapa geográfico do estado da Paraíba.



Adaptado de: PARAÍBA, 2013.

## 4.2 Local de estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Estadual da Paraíba, em Campina Grande – PB.

## 4.3 Genotipagem das amostras

### 4.3.1 Extração de DNA

Para realização da análise molecular foi executada a extração de DNA genômico a partir de amostras de sangue periférico de indivíduos com HC e indivíduos controles, obtidas por punção venosa (volume de 10 ml) e armazenadas a 4°C em tubos de coleta a vácuo contendo EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético). A extração do DNA foi realizada através do protocolo de extração orgânica proposto por Sambrook; Russel (2001).

### 4.3.2 Reação em Cadeia de Polimerase e Eletroforese

As amostras de DNA genômico obtidas foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação das regiões que compreendem os microssatélites D14S74 e D14S606, sendo empregados como iniciadores os oligonucleotídeos específicos descritos por Grasberger *et al.* (2005) que estão organizados na tabela 2:

**Tabela 2** – Oligonucleotídeos iniciadores dos microssatélites D14S74 e D14S606.

Gene	Marcador	Iniciadores
TSHR (14q31.1)	D14S74	Direto - 5'CCTGTACCACTACCTGAGTTGAGT 3' Reverso - 5'CTTTGGCTGCCCCGAAA 3'
TSHR (14q31.1)	D14S606	Direto - 5'AGGGGTCAGACTCTGTAAAGC 3' Reverso - 5'GTCTTCAATGTTTTAACTTTGTGG 3'

Adaptado de: GRASBERGER *et al.*, 2005.

O mesmo protocolo padronizado para reações de PCR foi utilizado para amplificação de ambos marcadores moleculares em estudo, porém os processos foram conduzidos em reações individuais. Cada reação contou com um volume total de 12,5 µl contendo 30-50ng de DNA genômico; 200 µM de cada dNTP; 10mM de Tris-HCl pH 8,8, 50mM de KCl, 1,6mM de MgCl<sub>2</sub> (Buffer 10X PCR Mg<sup>2+</sup> - Sinapse Inc.); 1U de *Taq* polimerase (Sinapse

Inc.); 1,0  $\mu$ M de cada iniciador. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Veriti 96-Well (Applied Biosystems) e o programa utilizado compreendeu um ciclo de desnaturação inicial de 4 min a 94°C, seguido por 30 ciclos desnaturação de 30s a 94°C, anelamento de 30s a 55°C, e extensão de 30s a 72°C, e um ciclo de extensão final de 6 min a 72°C.

A visualização e análise dos fragmentos amplificados pela PCR foi realizada através do processo de eletroforese em cuba vertical em gel de poliacrilamida (10%) e em gel de poliacrilamida (12%) desnaturante com glicerol 10%. Para a preparação das amostras aplicadas no gel desnaturante se utilizou 4 $\mu$ l do produto de PCR de cada indivíduo, 5 $\mu$ l de formamida e 3 $\mu$ l de tampão de amostra (Tris 10mM, pH 7.5; EDTA 10mM e Azul de Bromofenol). Foi realizada a desnaturação das amostras a 95°C por 5 minutos, e em seguida as mesmas foram colocadas imersas em gelo e imediatamente aplicadas no gel. A corrida de eletroforética foi desenvolvida em tampão do tipo TBE 1X, a 120 Volts e 36 miliAmperes durante um total de 340 minutos. A pré-corrída foi realizada com a mesma amperagem, porém com voltagem de 15Volts e duração de 15 minutos. A solução de nitrato de prata foi utilizada para coloração dos géis e a solução reveladora de Hidróxido de Sódio foi utilizada no final do processo, seguindo o protocolo de Crestes *et al.*(2001).

Para caracterização dos tamanhos dos fragmentos amplificados foram utilizados os marcadores padrões de peso molecular de 100pb (Kasvi e New England Biolabs inc.) e uma amostra de cada microssatélite em estudo com tamanho previamente definido através do sequenciamento direto e da observação no gel, que foram adotadas como marcadores internos.

#### **4.4 Análise estatística**

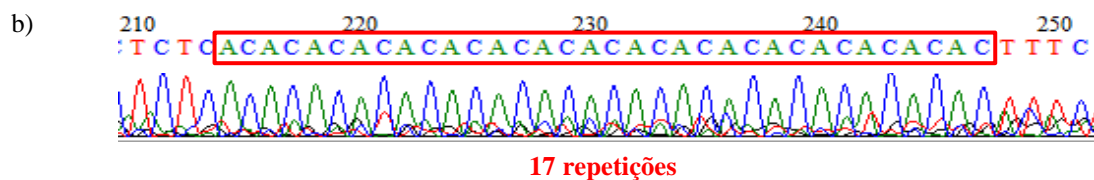
Os dados observados foram analisados pelo método de contagem direta dos alelos para a realização dos cálculos de frequências alélicas e genotípicas. O programa Arlequin 3.5. (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) foi utilizado para obtermos os valores de heterozigosidade observada, heterozigosidade esperada, heterozigosidade média observada e o índice de diversidade genética. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado através do cálculo do valor de p para o qual foi empregado o programa Genepop 4.2 (ROUSSET, 2008), e do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) assumindo-se o nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Sequenciamento de amostras para obtenção de marcadores internos

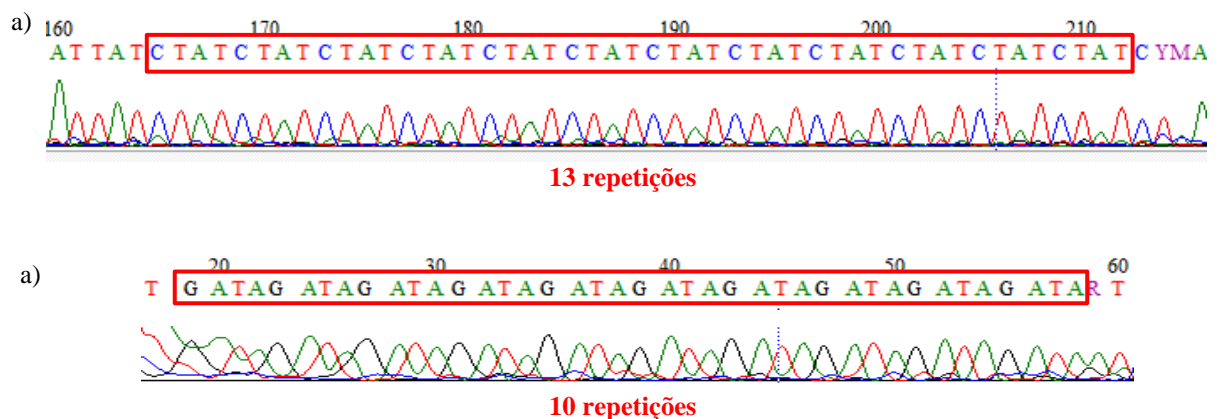
Por meio do sequenciamento direto foram obtidos os tamanhos dos fragmentos e o número de repetições dos microssatélites das amostras de dois pacientes selecionados, e estes foram utilizados como marcadores internos durante a contagem direta no gel para confirmação do tamanho dos alelos. Na figura 4 está representado o cromatograma referente ao microssatélite D14S74 (paciente n° 21 = 301pb e 295pb), e na figura 5 o cromatograma referente ao microssatélite D14S606 (paciente n° 3 = 266pb e 278pb).

**Figura 4** – Cromatograma do microssatélite D14S74 – Paciente n° 21.



Fonte: Elaborado pelo autor. a) Sequência no sentido direto referente ao microssatélite D14S74 (Dinucleótido: ACn) contendo 17 repetições - 301pb; Não obtivemos resultado satisfatório a partir do sequenciamento direto da sequência do outro alelo, e, portanto seu tamanho foi definido apenas por meio da contagem direta no gel de poli-acrilamida. Repetições dos nucleotídeos destacadas no campo em vermelho.

**Figura 5** – Cromatograma do microssatélite D14S606 – Paciente n° 3.

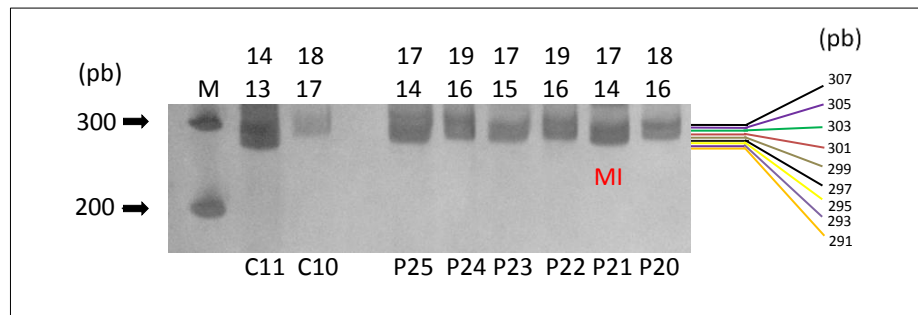


Fonte: Elaborado pelo autor. a) Sequência no sentido direto referente ao microssatélite D14S606 (GATAn), alelo contendo 13 repetições - 278pb; e b) Sequência no sentido reverso complementar referente ao microssatélite D14S606 (GATAn), alelo contendo 10 repetições - 266pb. Repetições destacadas no campo em vermelho.

## 5.2 Microssatélite D14S74

A reação de PCR para a amplificação do microssatélite D14S74 foi realizada a partir do DNA genômico de todos os indivíduos incluídos no estudo, e por meio da técnica de eletroforese em gel e do processo de contagem direta foi executada a análise dos fragmentos amplificados. Estes apresentaram uma variação de tamanho entre 291pb - 307pb, tendo sido observado um total de 9 alelos - 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 - denominados de acordo com o número de repetições estimadas para cada alelo (Figura 6).

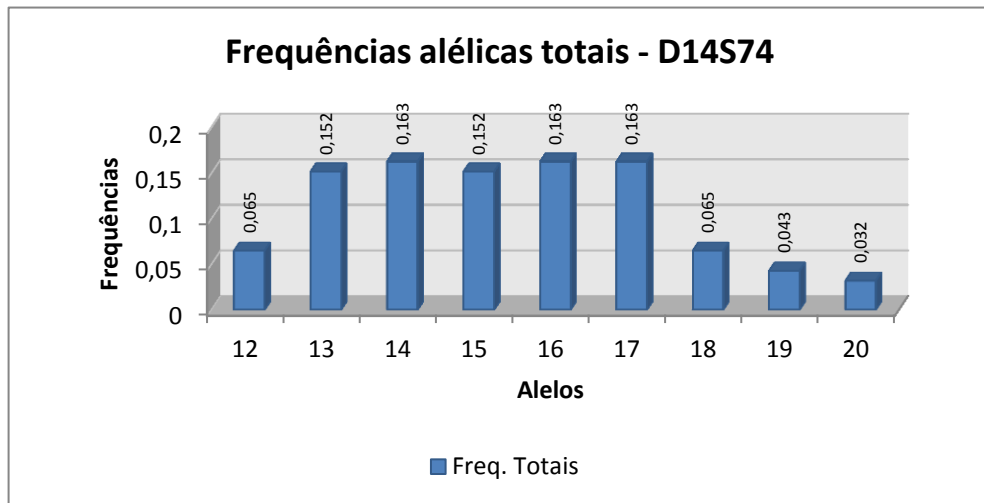
**Figura 6** – Gel de poliacrilamida (12%) desnaturante do microssatélite D14S74.



Fonte: Elaborado pelo autor. Os números acima do gel indicam os alelos correspondentes aos indivíduos presentes no mesmo (identificados abaixo). Do lado direito estão representadas as posições e os tamanhos em pares de base de cada alelo. M – marcador de peso molecular; Pb – pares de base; MI – Marcador interno P21 (alelos 14=295pb, e 17=301pb).

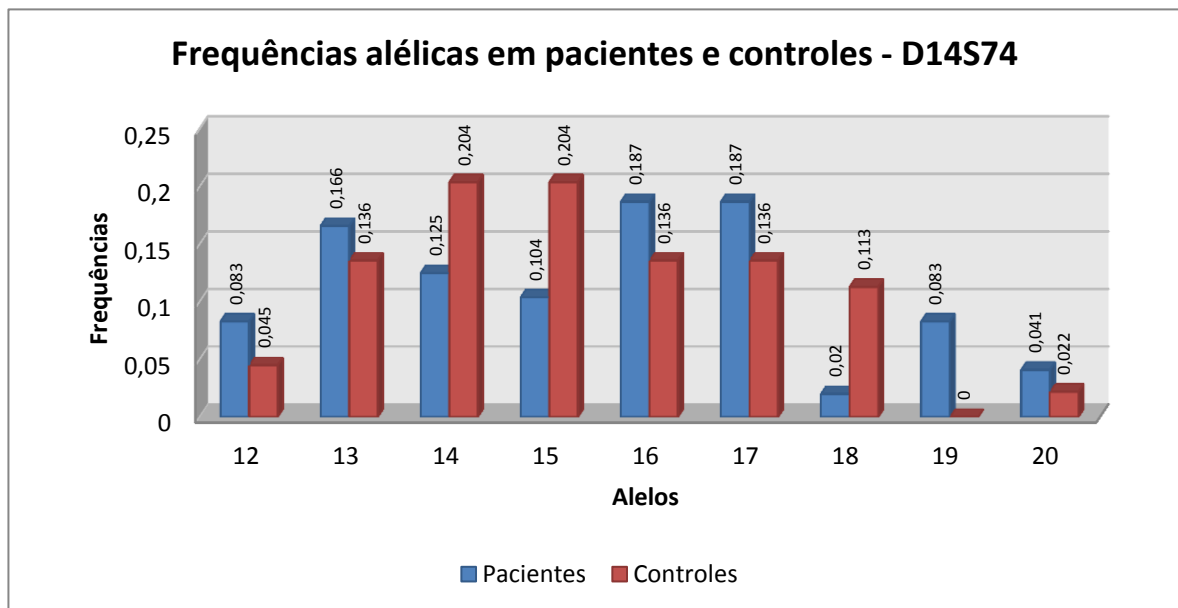
A partir dos dados dos alelos foram calculadas as frequências alélicas para o STR D14S74. Apenas o alelo 19 foi identificado como exclusivo para o grupo de pacientes. Todos os demais alelos encontram-se presentes em ambos os grupos em estudo. Os alelos 14, 16 e 17 apresentaram as maiores frequências dentro da amostra total de indivíduos (0,163). As frequências alélicas totais estão representadas no gráfico da Figura 7. Os alelos 14 e 15 exibiram as maiores frequências no grupo de pacientes (0,204), e os alelos 16 e 17 foram os mais frequentes em controles (0,187). A distribuição das frequências alélicas identificadas dentro dos grupos de pacientes e controles estão representadas no gráfico da Figura 8.

**Figura 7** - Distribuição das frequências alélicas totais - D14S74.



Fonte: Elaborado pelo autor.

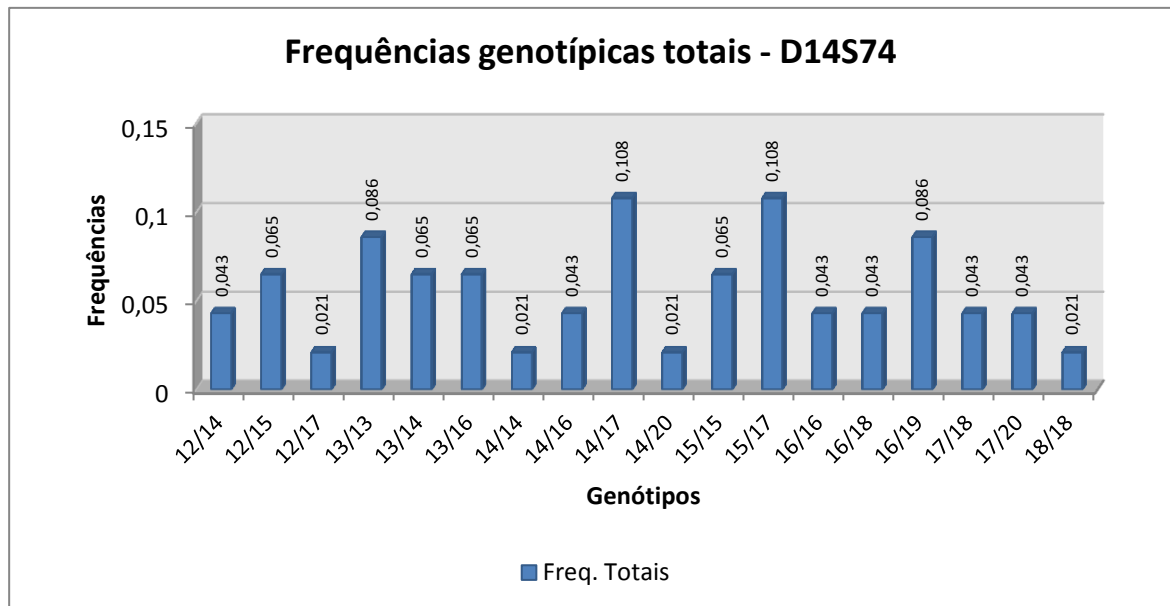
**Figura 8** - Distribuição das frequências alélicas em pacientes e controles - D14S74.



Fonte: Elaborado pelo autor.

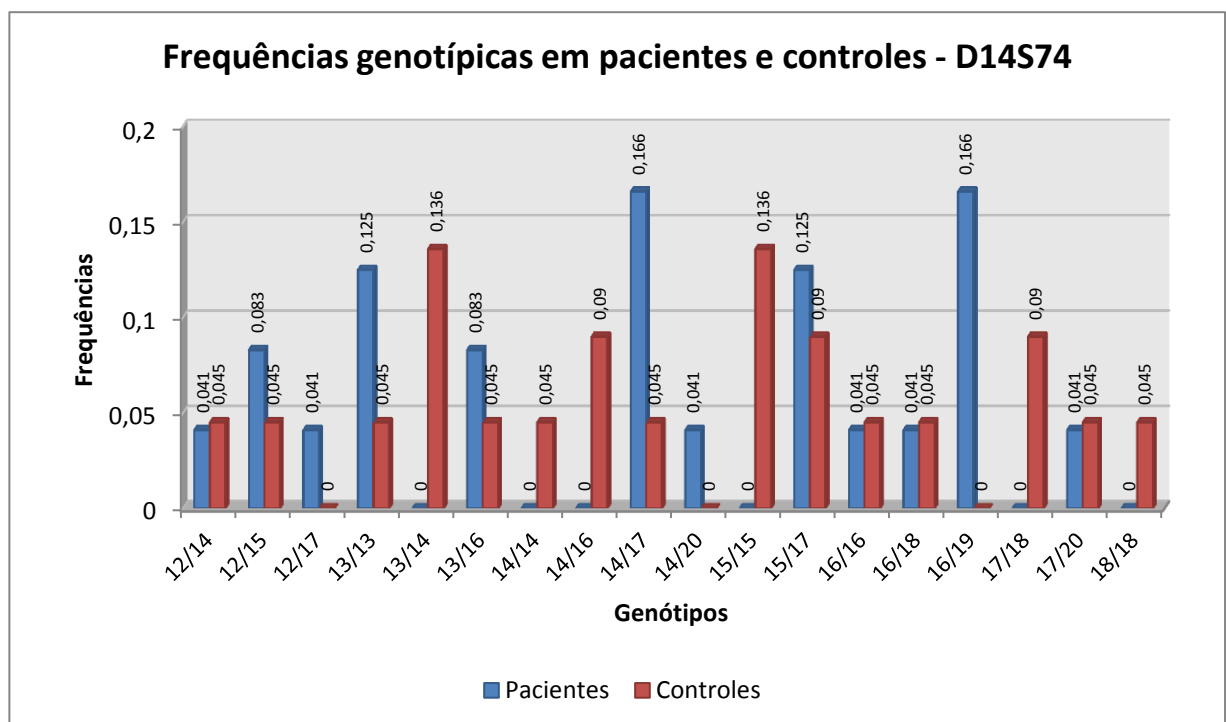
Foram realizados também os cálculos para as frequências genóticas, tendo sido encontrado um total de 18 genótipos diferentes, dos quais 12 estão presentes no grupo de pacientes e 15 no grupo de controles. Os gráficos das figuras 9 e 10 representam respectivamente as frequências genóticas totais e as frequências genóticas dentro de cada grupo.

**Figura 9** - Distribuição das frequências genótípicas totais - D14S74.



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 10** – Distribuição das frequências genótípicas em pacientes e controles - D14S74.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) no grupo de pacientes apresentou valor de 0,833 ( $p=0,000$ ) e em controles um valor de 0,681 ( $p=0,019$ ). A heterozigosidade média observada calculada foi de 0,760 ( $p=0,000$ ), e o índice de diversidade genética apresentou um valor de

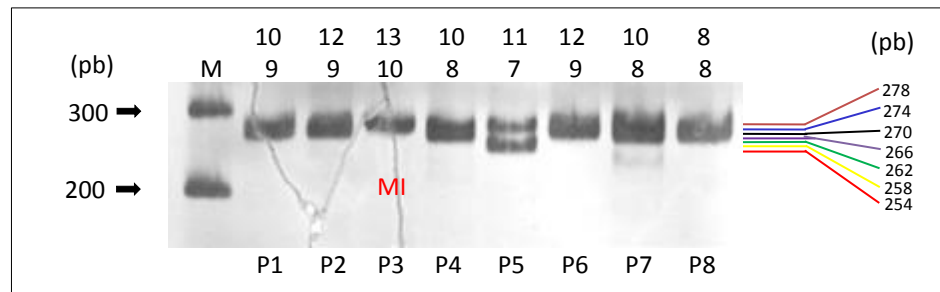


0,872 (SD = 0,010). O teste de concordância da amostra total com o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado através do programa Genepop em conjunto com o teste de qui-quadrado. Revelou-se o valor de  $\chi^2_{(1)} = 0,014$  ( $0,95 > p > 0,9$ ), demonstrando que não existe um desvio significativo entre os valores de  $H_o$  e  $H_e$  (heterozigosidade esperada) e, portanto, a amostra total encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

### 5.3 Microssatélite D14S606

A reação de PCR para amplificação do microssatélite D14S606 também foi realizada a partir do DNA genômico de todos os participantes da pesquisa. Novamente foram executados os mesmos procedimentos de eletroforese em gel e a contagem direta. Foram observados fragmentos com amplitude de tamanho variando entre 254pb - 278pb e um total de 7 alelos, denominados também com base no número de repetições estimada para cada alelo - 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 (Figura 11).

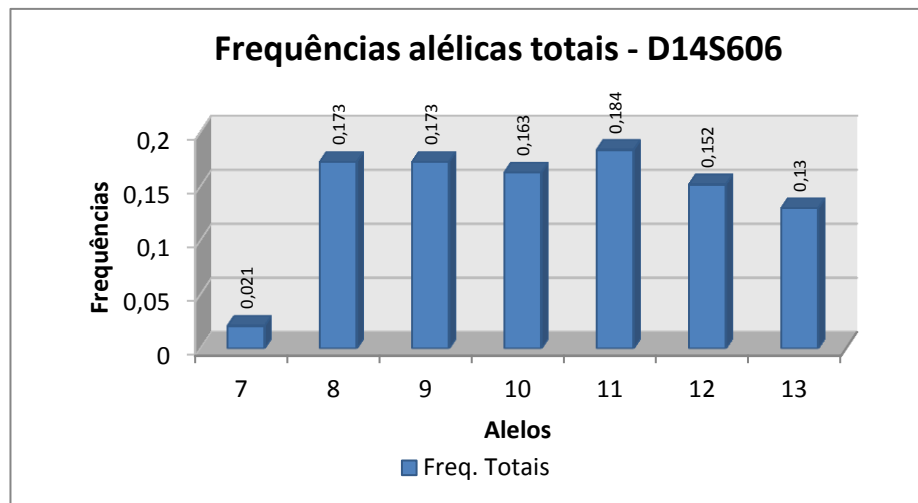
**Figura 11** - Gel de poliacrilamida (10%) do microssatélite D14S606.



Fonte: Elaborado pelo autor. Os números acima do gel indicam os alelos correspondentes aos indivíduos presentes no mesmo (identificados abaixo). Do lado direito estão representadas as posições e os tamanhos em pares de base de cada alelo. M – marcador de peso molecular; Pb – pares de base; MI – Marcador interno P3 (alelos 10=266pb, e 13=278pb).

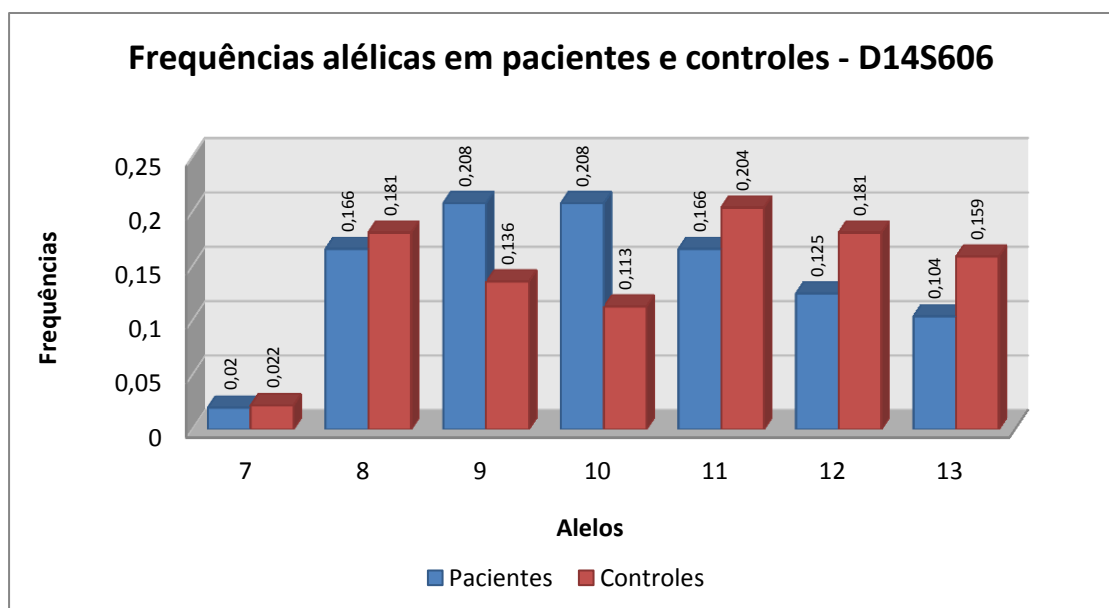
Durante o processo de cálculo das frequências alélicas para o STR D14S606 foi observado que os 7 alelos estão presentes em ambos os grupos em estudo e, portanto, não existem alelos exclusivos para nenhuma das populações em estudo. O alelo 11 exibiu a maior frequência dentro da amostra total de indivíduos (0,184). Os alelos 9 e 10 apresentaram as maiores frequências no grupo de pacientes (0,208), e o alelo 11 a maior frequência em controles (0,204). A distribuição das frequências alélicas totais estão representadas no gráfico da figura 12 e as observadas dentro de cada grupo estão representadas no gráfico da figura 13.

**Figura 12** – Distribuição das frequências alélicas totais - D14S606.



Fonte: Elaborado pelo autor.

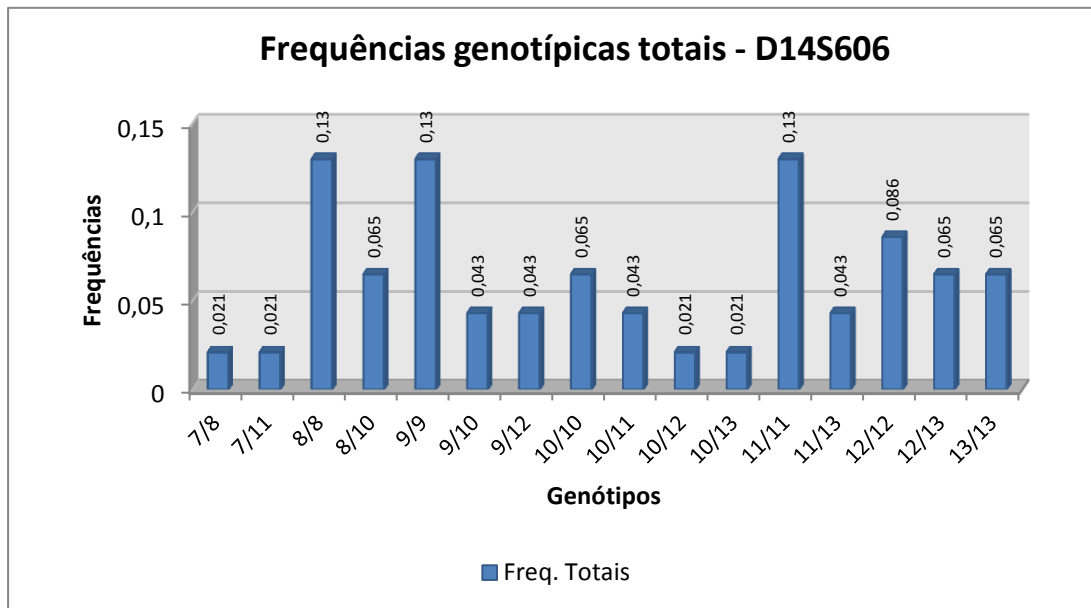
**Figura 13** - Distribuição das frequências alélicas em pacientes e controles - D14S606.



Fonte: Elaborado pelo autor.

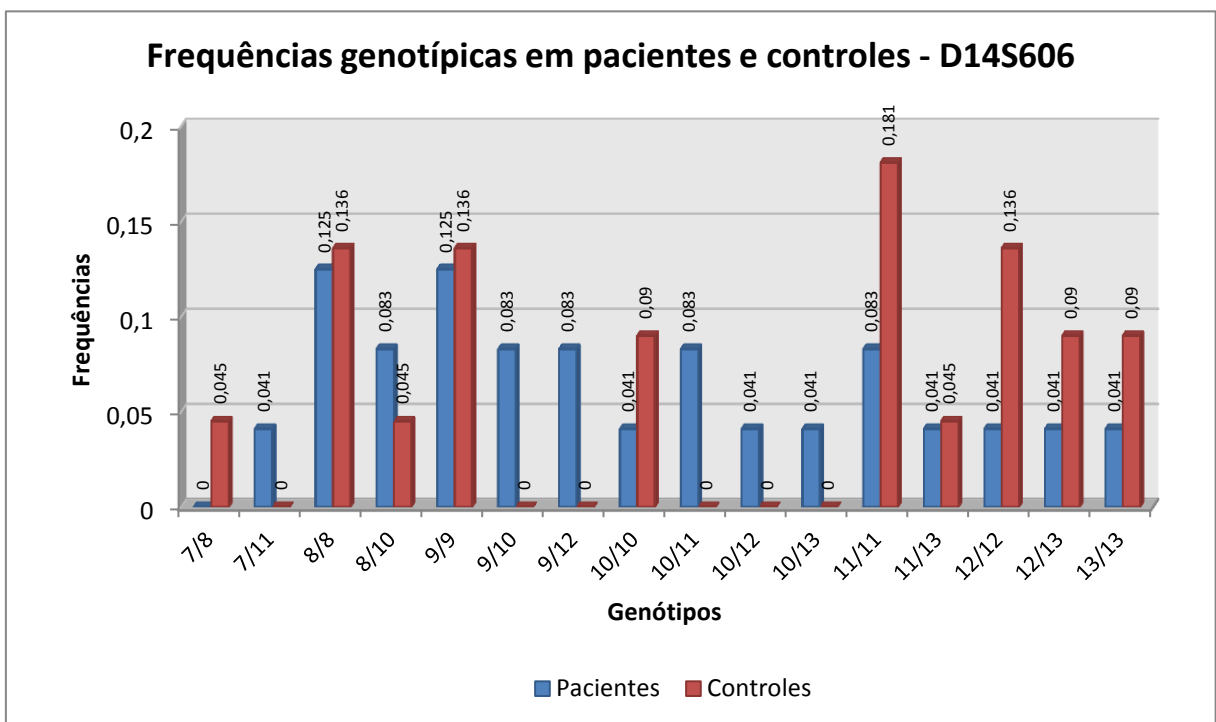
O procedimento de cálculo das frequências genotípicas também foi executado para o loco D14S606, sendo encontrado um total de 16 genótipos, dos quais 15 estão presentes no grupo de pacientes e 10 no grupo de controles. No gráfico da figura 14 estão representadas as frequências genotípicas totais e no gráfico da figura 15 as frequências genotípicas de cada grupo em estudo.

**Figura 14** – Distribuição das frequências genótípicas totais - D14S606.



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 15** - Distribuição das frequências genótípicas em pacientes e controles - D14S606.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) em pacientes apresentou valor de 0,541 ( $p=0,003$ ) e em controles o valor foi de 0,227 ( $p=0,000$ ). A taxa de heterozigosidade média observada da amostra total em estudo foi de 0,391 ( $p=0,000$ ), e o índice de diversidade genética apresentou

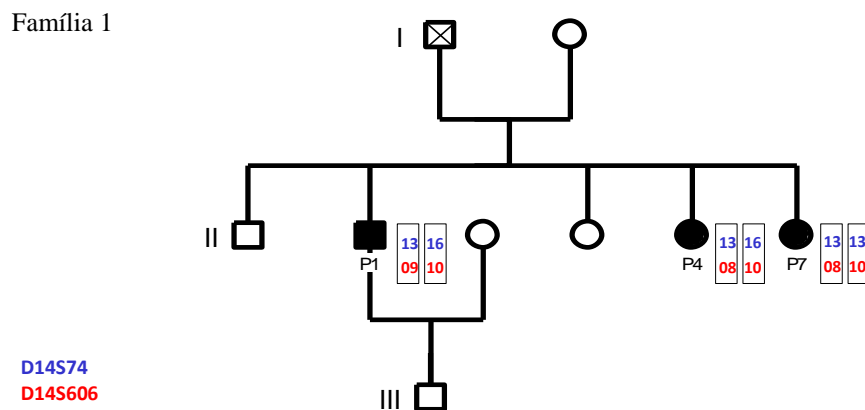
um valor de 0,847 (SD = 0,008). O teste de concordância com o equilíbrio de Hardy-Weinberg desenvolvido em conjunto com o teste de qui-quadrado revelou um valor de  $\chi^2_{(1)} = 0,245$  ( $0,9 > p > 0,10$ ) demonstrando não haver desvio significativo entre os valores de  $H_o$  e  $H_e$  (heterozigosidade esperada), e que a amostra total está em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

#### 5.4 Segregação mendeliana em casos familiares

Foram elaborados heredogramas para representação gráfica da segregação mendeliana dos alelos observados (correspondentes aos microssatélites D14S74 e D14S606) em três casos familiares que contemplavam indivíduos do conjunto de pacientes de nossa amostra, com a finalidade de verificar a existência de alelos específicos ligados ao fenótipo do Hipotireoidismo Congênito dentro destes grupos. Para construção dos heredogramas recorreu-se a utilização do programa GenoPro 2.0.1.1. (MORIN, 2007).

No heredograma da figura 16 estão representados os membros da família 1, grupo composto por indivíduos provenientes do município de Queimadas e que apresenta 3 irmãos acometidos pelo HC (P1, P4 e P7).

**Figura 16** – Heredograma da família 1 com os genótipos dos pacientes 1, 4 e 7.



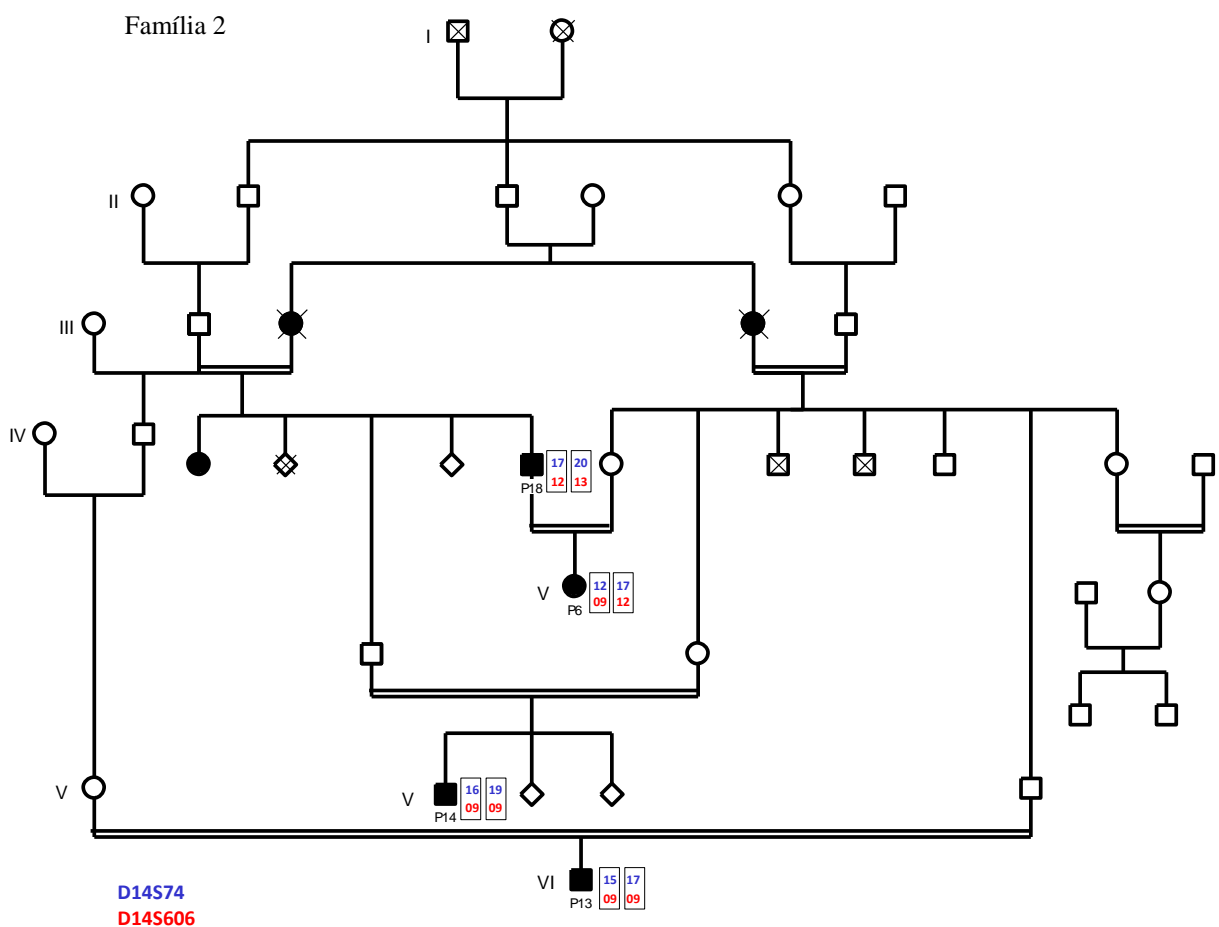
Fonte: Elaborado pelo autor. Os genótipos correspondentes ao STR D14S74 estão destacados em azul, e os correspondentes ao STR D14S606 estão destacados em vermelho.

De acordo com o que se observa neste primeiro caso os pacientes 1 e 4 apresentam o genótipo heterozigoto 13/16 para o STR D14S74, diferente do paciente 7 que apresenta o genótipo homozigoto 13/13, o que sugere que ambos os pais (não incluídos em nossa amostra) possuam o alelo 13, e que ao menos um deles possua o alelo 16. Para o STR D14S606 todos os indivíduos apresentam genótipos heterozigotos, sendo que os pacientes 4 e

7 compartilham o mesmo genótipo 08/10, enquanto que o paciente 1 possui o genótipo 09/10. Possivelmente os pais também estejam em heterozigose para este loco, ou ao menos um possua o genótipo homozigoto para o alelo 10 e o outro o genótipo heterozigoto para os alelos 08 e 09.

Os membros da família 2 estão representados no heredograma da figura 17, família natural do município de Boa Vista que apresenta 4 casos de indivíduos acometidos pelo HC (P6, P18, P13 e P14).

**Figura 17** – Heredograma da família 2 com os genótipos dos pacientes 6, 13, 14 e 18.



Fonte: Elaborado pelo autor. Os genótipos correspondentes ao STR D14S74 estão destacados em azul, e os genótipos correspondentes ao STR D14S606 estão destacados em vermelho.

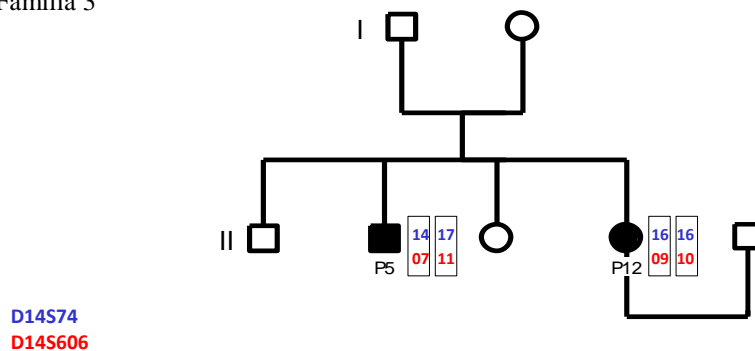
No heredograma deste segundo grupo são observados quatro casos de pacientes com o fenótipo do HC, todos provenientes de uniões consanguíneas entre primos de 1º e 2º graus. Em um destes casos é verificamos que possivelmente tenha ocorrido a transmissão do conjunto de alelos 17 do microssatélite D14S74 e 12 do microssatélite D14S606 do pai (P18) para sua filha (P6). Os pacientes P13 e P14 exibem diferentes genótipos heterozigotos (15/17

e 16/19 respectivamente) para o loco D14S74, o que aponta a heterozigose em ao menos um dos pais nos dois casos (não incluídos em nossa amostra), e compartilham o mesmo genótipo homozigoto 09/09 para o loco D14S606, sendo permitido inferir que ambos os pais compartilham o alelo 09. Também foram relatados outros casos de pessoas na família 2 afetadas pelo HC que não estão inclusos em nossa amostra.

O terceiro heredograma (Figura 18) retrata a família 3, grupo proveniente do município de Taperoá que apresenta 2 casos de irmãos acometidos pelo HC (P5 e P12).

**Figura 18** – Heredograma da família 3 com os genótipos dos pacientes 5 e 12.

Família 3



Fonte: Elaborado pelo autor. Os genótipos correspondentes ao STR D14S74 estão destacados em azul, e os genótipos correspondentes ao STR D14S606 estão destacados em vermelho.

Neste último caso familiar acompanhado em nosso estudo observou-se que o paciente 5 apresenta o genótipo heterozigoto 14/17 e o paciente 12 o genótipo homozigoto 16/16 para o microssatélite D14S74, situação que indica que os pais (não incluídos em nossa amostra) estejam em heterozigose, e que existe a presença do alelo 16 em ambos os seus genótipos. Em relação ao microssatélite D14S606, os dois pacientes apresentam genótipos em heterozigose, sendo que o paciente 5 possui o genótipo 07/11 e o paciente 12 possui o genótipo 09/10, o que nos permite deduzir que ambos os progenitores também encontram-se em heterozigose para este loco.

Na avaliação dos heredogramas dos três grupos de maneira conjunta são verificados os alelos 16 e 17 para o STR D14S74 e o alelo 9 para o STR D14S606 como os que apresentam as maiores frequências. Em relação aos genótipos não houve destaque no que diz respeito a frequências elevadas.

## 6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos os microssatélites têm atraído a atenção dos pesquisadores para a associação entre a instabilidade do número de repetições e doenças genéticas humanas (OLIVEIRA, 2006). A exemplo disso encontram-se os microssatélites D14S74 e D14S606, marcadores moleculares que figuram entre os locos escolhidos em estudos para análise da resistência ao TSH e o Hipotireoidismo Congênito.

Neste estudo foram realizadas a genotipagem e a caracterização de alelos dos microssatélites D14S74 e D14S606 em dois grupos distintos (24 pacientes afetados por HC e 22 controles) do estado da Paraíba, com o objetivo de verificar a possível associação entre alelos específicos destes marcadores e o fenótipo do HC.

Segundo o que se observa na análise da segregação mendeliana dos três casos familiares acompanhados no presente trabalho, não são identificados alelos específicos para nenhum dos grupos, visto que estes compartilhavam alelos entre si e entre os grupos de pacientes e controles. Observou-se que os alelos mais frequentes para o STR D14S74 são os 16 e 17, e para o STR D14S606 o alelo 9. Tais alelos também exibem frequências elevadas dentro do grupo dos pacientes e na amostra total, fato que pode sugerir que os mesmos estejam segregando em conjunto com mutações no gene do TSHR. No entanto, não é possível inferir a existência da relação entre os alelos encontrados nas famílias em estudo e o fenótipo de HC por ausência de indicativos relevantes.

Um cenário semelhante pode ser verificado no trabalho publicado por Grasberger *et al.* (2005) onde tais marcadores foram utilizados para análise por haplotipagem com cinco famílias sem ligação genealógica - provenientes de países como França, Israel, Estados Unidos e Canadá - que apresentavam em comum membros com o quadro de resistência ao TSH, e estes demonstraram-se informativos para análise de ligação, mas a herança dos haplótipos inferidos foi discordante para a associação com o fenótipo de resistência ao TSH. Este quadro difere dos encontrados em estudos realizados com indivíduos de famílias de origem árabe, onde foram observados haplótipos específicos que contemplavam os microssatélites D14S74 e D14S606 segregando em conjunto com mutações no gene do TSHR como p.L653V, p.P68S, p.L89L e p.Q90P, alterações capazes de provocar a condição de resistência ao TSH e conseqüentemente o fenótipo de HC (GRASBERGER *et al.*, 2007; TENENBAUM-RAKOVER *et al.*, 2009; SRIPHAPRADANG *et al.*, 2012).

Estudos complementares que contam com a realização do sequenciamento do gene TSHR podem confirmar a existência da relação entre mutações neste gene e alelos específicos dos microssatélites D14S74 e D14S606 em pacientes da nossa amostra.

Ainda sobre os grupos familiares analisados é possível verificar no caso da família 2 a ocorrência de casamentos consanguíneos entre indivíduos de diversas gerações, ação bastante recorrente em populações de cidades pequenas do interior do nordeste brasileiro que pode ter favorecido o surgimento de indivíduos afetados pelo HC dentro deste grupo. De acordo com Modell; Darr (2002) tal condição aumenta a chance de que as pessoas que compõem estes casais apresentem alguma variante genética recessiva, o que contribui com o aumento na prevalência de nascimentos de crianças atingidas por graves doenças de padrão recessivo.

O genótipo 16/19 correspondente ao microssatélite D14S74 foi identificado somente no grupo dos pacientes, com uma frequência de 0,166, o que pode indicar uma possível associação deste genótipo com o fenótipo afetado, porém o tamanho reduzido da amostra (n=46) em estudo pode ser um fator que eventualmente tenha favorecido este quadro. Tal genótipo é encontrado no paciente 14 pertencente à família 2. É necessário destacar também que o alelo 19 está presente apenas no grupo de pacientes (com uma frequência de 0,083), fato que pode apoiar esta associação ao HC.

Dados da triagem molecular do STR D14S606 foram utilizados no estudo de mecanismos genéticos relacionados à malária no estado de Rondônia, e foi verificado um total de 5 alelos para tal marcador, com os alelos 11 e 9 como os mais frequentes (0,527 e 0,203 respectivamente) (FEREIRA, 2008). Nossa amostra, apesar de apresentar os alelos 11 e 9 (0,184 e 0,173) também como os mais frequentes, teve o alelo 8 (não identificado em Rondônia) também com frequência elevada (0,173), e exibiu valores de frequências alélicas em geral mais equiparados. Este foi o único estudo de nosso conhecimento executado no Brasil que contemplou um dos microssatélites abordados em nosso trabalho.

O valor da heterozigosidade média observada em nossa amostra total para o STR D14S74 foi de 0,760 ( $p=0,000$ ), dado bastante próximo ao que fora encontrado em estudos realizados com indivíduos de populações como as do Japão (0,80) (FURUSHIMA *et al.*, 2002; ONDA *et al.*, 2001), França (0,79) (GYAPAY *et al.*, 1994) Taiwan (0,76) (JOU *et al.*, 2005) e Tunísia (0,666) (MAALEJ *et al.*, 2004). Diante de um valor de  $H_o$  considerado alto e de um pequeno tamanho amostral (n=46) em estudo é possível inferir a existência de uma grande diversidade genética em nossa população. Além disso, o índice de diversidade genética calculada para este loco foi de 0,872 (SD = 0,010), e também está em concordância com uma alta diversidade genética.



Situação contrária foi identificada para a heterozigosidade média observada no STR D14S606, que exibiu um valor de 0,391 ( $p=0,000$ ), considerado baixo em comparação com os valores demonstrados por populações como a Holanda (0,69) (TILBURG *et al.*, 2003) e Taiwan (0,61) (JOU; PAN, 2005). Embora o valor da heterozigosidade média tenha se demonstrado baixo, o índice de diversidade genética calculado apresentou um valor de 0,847 ( $SD = 0,008$ ), apontando que também existe uma alta diversidade genética para este marcador dentro da população paraibana.

Em um recente trabalho desenvolvido por Melo (2012) foi realizada a análise da interação entre o microssatélite HumTPO e o fenótipo de HC utilizando-se exatamente as mesmas amostras de DNA do presente estudo, sendo observado um valor de  $H_o$  de 0,687 para tal marcador molecular, o que corrobora com a alta diversidade genética de nossa amostra.

O Brasil é um país onde é encontrada uma população geneticamente heterogênea, produto da miscigenação entre povos ameríndios, europeus e africanos (PENA *et al.*, 2011). Dados adquiridos a partir da triagem de polimorfismos em 12 locos de microssatélites demonstram que na região Nordeste do país são apresentadas as seguintes proporções de ancestralidade: linhagem europeia = 73%, linhagem africana = 17% e linhagem ameríndia = 10% (CALLEGARI-JACQUES *et al.*, 2003). Este fato pode explicar o motivo da diversidade genética notada em nossa população em estudo.

De acordo com os valores obtidos através do teste de qui-quadrado ambos os microssatélites analisados apresentaram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Com base nos dados observados no presente trabalho é possível inferir que os alelos referentes aos marcadores moleculares examinados não estão em associação com o fenótipo do Hipotireoidismo Congênito.

As informações obtidas acerca dos alelos e suas frequências em nossa amostra serão adicionados a estudos em conjunto com dados de outros marcadores moleculares para seja obtido o entendimento da relação destes marcadores com o HC. O estudo dos genes envolvidos na síntese dos HTs também irá auxiliar no esclarecimento do distúrbio na região da Paraíba. Ações de diagnóstico molecular em indivíduos com Hipotireoidismo Congênito são de extrema importância para o estabelecimento de condutas clínicas preventivas como o aconselhamento genético e o tratamento precoce, procedimentos que evitam novos casos dessa doença que é causa mais comum para o retardo mental considerado evitável.

## 7 CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos durante a execução do presente trabalho, observa-se que a amostra de pacientes com HC por disormonogênese e de controles em estudo encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os locos dos microssatélites D14S74 e D14S606. Também se verifica que ambos os marcadores moleculares apresentam índices elevados de diversidade genética.

Através dos valores de frequências alélicas e genotípicas e do estudo da segregação mendeliana em grupos familiares, foi possível concluir que não existe associação entre nenhum alelo específico dos microssatélites analisados e o fenótipo do Hipotireoidismo Congênito.

Os dados obtidos das frequências alélicas referentes aos microssatélites analisados serão utilizados em conjunto com outros marcadores polimórficos para compreensão da dinâmica populacional destes marcadores na população paraibana e a elucidação da possível relação com o Hipotireoidismo Congênito.

## REFERÊNCIAS

- BEARDSALL, K.; OGILVY-STUART, A. L. Congenital hypothyroidism. **Current Paediatrics**, v. 14, p. 422-429, 2004.
- CANGUL, H.; AYCAN, Z.; OLIVERA-NAPPA, A.; SAGLAM, H.; SCHOENMAKERS, N. A.; BOELAERT, K.; CETINKAYA, S.; TARIM, O.; BOBER, E.; DARENDELILER, F.; BAS, V.; DEMIR, K.; AYDIN, B. K.; KENDALL, M.; COLE, T.; HOGLER, W.; CHATTERJEE, V. K. K.; BARRETT, T. G.; MAHER, E. R. Thyroid dysmorphogenesis is mainly caused by TPO mutations in consanguineous community. **Clinical Endocrinology**, v. 79, p. 275-281, 2013.
- CASSIO, A.; NICOLETTI, A.; RIZZELLO, A.; ZAZZETTA, E.; BAL, M.; BALDAZZI, L. Current Loss-of-Function Mutations in the Thyrotropin Receptor Gene: When to Investigate, Clinical Effects, and Treatment. **Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology**, v. 5, p. 29-39, 2013.
- CASTANET, M.; LYONNET, S.; BONAÏTI-PELLIÉ, C.; POLAK, M.; CZERNICHOV, P.; LÉGER, J. Familial Forms of Thyroid Dysgenesis among Infants with Congenital Hypothyroidism. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 6, p. 441-442, 2000.
- CHEN, C.; LEE K.; LEE, C. T.; LAI, W.; HUANG, Y. Epidemiology and Clinical Characteristics of Congenital Hypothyroidism in an Asian Population: A Nationwide Population-Based Study. **Journal of Epidemiology**, v. 23, n. 2, p. 85-94, 2013.
- CLIFTON-BLIGH, R. J.; GREGORY, J. W.; LUDGATE, M.; JOHN, R.; PERSANI, L.; ASTERIA, C.; BECK-PECCOZ, P.; CHATTERJEE, V. K. K. Two Novel Mutations in the Thyrotropin (TSH) Receptor Gene in a Child with Resistance to TSH. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, n. 4, p. 1094-1100, 1997.
- CORBETTA, C.; WEBER, G.; CORTINOVIS, F.; CALEBIRO, D.; PASSONI, A.; VIGONE, M. C.; BECK-PECCOZ, P.; CHIUMELLO, G.; PERSANI, L. A 7-year experience with low blood TSH cutoff levels for neonatal screening reveals an unsuspected frequency of congenital hypothyroidism (CH). **Clinical Endocrinology**, v. 71, p. 739-745, 2009.
- CORVILAIN, B.; VAN SANDE J.; DUMONT, J. E.; VASSART, G. Somatic and germline mutations of the TSH receptor and thyroid diseases. **Clinical Endocrinology**, v. 55, p. 143-158, 2001.
- CRESTES, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Report**, v. 19, p. 299-306, 2001.
- DAVIES, F. T.; Yin, X.; LATIF, R. The Genetics of the Thyroid Stimulating Hormone Receptor: History and Relevance. **Mary Ann Liebert, Inc**, v. 20, n. 7, p. 727-736, 2010.
- DE FELICE, M.; DI LAURO, R.. Thyroid Development and Its Disorders: Genetics and Molecular Mechanisms. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 5, p. 722-746, 2004.

DE LA VIEJA, A.; DOHAN, O.; LEVY, O.; CARRASCO, N. Molecular Analysis of the Sodium/Iodide Symporter: Impact on Thyroid and Extrathyroid Pathophysiology. **Physiological reviews**, v. 80, n. 3, p. 1083-1105, 2000.

DURAN, C.; APPLEBY, N.; EDWARDS, D.; BATLEY, J. Molecular Genetic Markers: Discovery, Applications, Data Storage and Visualisation. **Current Bioinformatics**, v. 4, p. 16-27, 2009.

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

FERREIRA, R. G. M. **Genética epidemiológica de malária em Rondônia**. 2008. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências - Biologia da relação patógeno-hospedeiro ). Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 2008.

FURUSHIMA, K.; SHIMO-ONODA, K.; MAEDA, S.; NOBUKUNI, T.; IKARI, K.; KOGA, H.; KOMIYA, S.; NAKAJIMA, T.; HARATA, S.; INOUE, I. Large-Scale Screening for Candidate Genes of Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the spine. **Journal of bone and mineral research**, v. 17, n. 1, p. 128-137, 2002.

GILLAM, M.P.; KOPP, P. Genetic regulation of thyroid development. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 13, p. 358-363, 2001a.

GILLAM, M.P.; KOPP, P. Genetic defects in thyroid hormone synthesis. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 13, p. 364-372, 2001b.

GRASBERGER, H.; MIMOUNI-BLOCH, A.; VANTYGHM, M. C.; VAN VLIET, G.; ABRAMOWICZ, M.; METZGER, D.L.; ABDULLATIF, H.; RYDLEWSKI, C.; MACCHIA P.E.; SCHERBERG, N.H.; VAN SANDE, J.; MIMOUNI, M.; WEISS, R. E.; VASSART, G.; REFETOFF, S. Autosomal Dominant Resistance to Thyrotropin as a Distinct Entity in Five Multigenerational Kindreds: Clinical Characterization and Exclusion of Candidate Loci. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, n. 7, p. 4025-4034, 2005.

GRASBERGER, H.; REFETOFF, S. Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dysmorphogenesis. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 23, n. 4, p. 421-428, 2011.

GRASBERGER, H.; VAN SANDE, J.; MAHAMEED, A. H.; TENENBAUM-RAKOVER, Y.; REFETOFF, S. A Familial Thyrotropin (TSH) Receptor Mutation Provides in Vivo Evidence that the Inositol Phosphates/ Ca<sup>2</sup> Cascade Mediates TSH Action on Thyroid Hormone Synthesis. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 7, p. 2816-2820, 2007.

GREENBERG, D. A. Linkage Analysis of "Necessary" Disease Loci versus "Susceptibility" Loci. **The American Journal of Human Genetics**, v. 52, p. 135-143, 1993.

GROSS, B.; MISRAHI, M.; SAR, S.; MILGROM, E. Composite Structure of the Human Thyrotropin Receptor Gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 177, n. 2, p. 679-687, 1991.

GRUTERS, A. Screening for congenital hypothyroidism - Effectiveness and clinical outcome. **Baillière's Clin Paediatr**, v. 4, p. 1-18, 1996.

GYAPAY, G.; MORISSETTE, J.; VIGNAL, A.; DIB, C.; FIZAMES, C.; MILLASSEAU, P.; MARC, S.; BERNARDI, G.; LATHROP, M.; WEISSENBACH, J. The 1993-94 G n thon human genetic linkage map. **Nature Genetics**. v. 7, p. 246-339, 1994.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HIRSCHHORN, J. N.; LOHMUELLER, K.; BYRNE, E.; HIRSCHHORN, K. A comprehensive review of genetic association studies. **Genetics in Medicine**, v. 4, n. 2, p. 45-61, 2002.

JORDAN, N.; WILLIAMS, N.; GREGORY, J.W.; EVANS, C.; OWEN, M.; LUDGATE, M. The W546X mutation of the thyrotropin receptor gene: potential major contributor to thyroid dysfunction in a Caucasian population. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 3, p. 1002-1005, 2003.

JOU, Y.; SUN, H. S.; LEE, T. Locus Name: D14S74. Probe Name : AFM210ZH4. **TPMD: Taiwan Polymorphis Marker Database**. 2005. Disponível em: <<http://tpmd2.nhri.org.-tw/tpmd/php-bin/filter.php?search=AFM210ZH4&lang=en>>. Acesso em: 11 dez. 2014.

JOU, Y.; PAN, W. Locus Name: D14S606. Probe Name : GATA30A03. **TPMD: Taiwan Polymorphis Marker Database**. 2005. Disponível em: <<http://tpmd2.nhri.org.tw/tpm-d/php-bin/filter.php?search=GATA30A03&lang=en>>. Acesso em: 11 dez. 2014.

KAMBE, F.; SEO, H. Thyroid-Specific Transcription Factors. **Endocrine Journal**, v. 44, n. 6, p. 775-784, 1997.

KIDD, K. K. Polymorphism Information: D14S606 Tetranucleotide STRP. **ALFRED: The allele frequency database**. 2014. Disponível em: <<http://alfred.med.yale.edu/alfred/recor-dinfo.asp?UNID=SI001868X#references>>. Acesso em: 9 jan. 2015.

KIMPTON, C. P.; GILL, P.; WALTON, A.; URQUHART, A.; MILLICAN, E. S.; ADAMS, M. Automated DNA Profiling Employing Multiplex Amplification of Short Tandem Repeat Loci. **Genome Research**, v. 3, p. 13-22, 1993.

KIMURA, E. T. Glândula Tireóide. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 991-1014.

KLETT, M. Epidemiology of Congenital Hypothyroidism. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 105, p. 19-23, 1997.

KOPP, P. Human Genome and Diseases: Review. The TSH receptor and its role in thyroid disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p. 1301-1322, 2001.

KOPP, P. Perspective: Genetic Defects in the Etiology of Congenital Hypothyroidism. **Endocrinology**, v. 143, n. 6, p. 2019-2024, 2002.

KOSTOGLU-ATHANASSIOU, I.; NTALLES, K. Hypothyroidism - new aspects of an old disease. **Hippokratia**, v. 14, n. 2, p. 82-87, 2010.

KNOBEL, M.; NOGUEIRA, C. R.; MEDEIROS-NETO, G. Genética Molecular do Hipotireoidismo Congênito. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 1, p. 24-31, 2001.

MAALEJ, A.; REBAI, A.; AYADI, A.; JOUIDA, J.; MAKNI, H.; AYADI, H. Allelic structure and distribution of 103 STR loci in a Southern Tunisian population. **Journal of Genetics**, v. 83, n. 1, p. 65-71, 2004.

MACIEL, L. M. Z.; KIMURA, E. T.; NOGUEIRA, C. R., MAZETO, G. M. F. S.; MAGALHÃES, P. K. R.; NASCIMENTO, M. L.; NESI-FRANÇA, S.; VIEIRA, S. E. Congenital hypothyroidism: recommendations of the Thyroid Department of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, n. 3, p. 184-192, 2013.

MODELL, B.; DARR, A. Genetic counselling and customary consanguineous marriage. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 225-229, 2002.

MORIN, D. **GenoPro**, Versão 2.0.1.1. 2007. Disponível em: <<http://www.genopro.com/>>. Acesso em: 16 dez. 2014.

MELO, A. R. S. **Genotipagem de Microsatélite no Gene TPO em Pacientes com Hipotireoidismo Congênito**. 2012. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação em Ciências Biológicas), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.

MISRAHI, M.; LOOSFELT, H.; ATGER, M.; SAR, S.; GUIOCHON-MANTEL, A.; MILGROM, E. Cloning, Sequencing and Expression of Human TSH Receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 166, n. 1, p. 394-403, 1990.

MURRAY, J.; SHEFFIELD, V.; WEBER, J. L.; DUYK, G.; BUETOW, K. H. **HUMAN STS CHLC.GATA30A03.P14606 clone GATA30A03, sequence tagged site**. National Center for Biotechnology Information – Nucleotide Database. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/G09049>>. Acesso em: 2 jul. 2013.

NARUMI, S.; MUROYA, K.; ABE, Y.; YASUI, M.; ASAKURA, Y.; ADACHI, M.; HASEGAWA, T. TSHR Mutations as a Cause of Congenital Hypothyroidism in Japan: A Population-Based Genetic Epidemiology Study. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 4, p. 1317-1323, 2009.

NICOLETTI, A.; BAL, M.; DE MARCO, G.; BALDAZZI, L.; AGRETTI, P.; MENABO, S.; BALLARINI, E.; CICOGNANI, A.; TONACCHERA, M.; CASSIO, A. Thyrotropin-Stimulating Hormone Receptor Gene Analysis in Pediatric Patients with Non-Autoimmune Subclinical Hypothyroidism. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 11, p. 4187-4194, 2009.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

ONDA, H.; KASUYA, H.; YONEYAMA, T.; TAKAKURA, K.; HORI, T.; TAKEDA, J.; NAKAJIMA, T.; INOUE, I. Genomewide-Linkage and Haplotype-Association Studies Map Intracranial Aneurysm to Chromosome 7q11. **The American Journal of Human Genetics**, v. 69, p. 804-819, 2001.

PARAÍBA (Estado). Secretaria Estadual de Saúde. **Mamografias**. Paraíba, 2013. Disponível em: <<http://www.saude.pb.gov.br/ses.php>>. Acesso em: 12 nov. 2014.

PARK, S.; CLIFTON-BLIGH, R. J.; BETTS, P.; CHATTERJEE, V. K. K. Congenital hypothyroidism and apparent athyreosis with compound heterozygosity or compensated hypothyroidism with probable hemizygoty for inactivating mutations of the TSH receptor. **Clinical Endocrinology**, v. 60, p. 220-227, 2004.

PASCHKE, R., LUDGATE, M. Mechanisms of Disease: The Thyrotropin Receptor in Thyroid Diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 23, p. 1675-1681, 1997.

PENA, S.D.; DI PIETRO, G.; FUCHSHUBER-MORAES, M.; GENRO, J.P.; HUTZ, M.H.; KEHDY, F. S.; KOHLRAUSCH, F.; MAGNO, L.A.; MONTENEGRO, R.C.; MORAES, M.O.; DE MORAES, M.E.; DE MORAES, M.R.; OJOPI, E.B.; PERINI, J.A.; RACCIOPI, C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K.; RIOS-SANTOS, F.; ROMANO-SILVA, M.A.; SORTICA, V.A.; SUAREZ-KURTZ, G. The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. 1-9, 2011.

PERONE, D.; TEIXEIRA, S. S.; CLARA, S. A.; SANTOS, D. C. dos; NOGUEIRA, C. R. Aspectos Genéticos do Hipotireoidismo Congênito. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 1, p. 62-69, 2004.

PERSANI, L.; CALEBIRO, D.; CORDELLA, D.; WEBER, G.; GELMINIA, G.; LIBRI, D.; FILIPPIS, T. de; BONOMI, M. Genetics and phenomics of hypothyroidism due to TSH resistance. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 322, p. 72-82, 2010.

PERSANI, L. Central Hypothyroidism: Pathogenic, Diagnostic, and Therapeutic Challenges. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 9, p. 3068-3078, 2012.

- RAMALHO, A. R. O.; RAMALHO, R. J. R.; OLIVEIRA, C. R. P.; SANTOS, E. G.; OLIVEIRA, M. C. P.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Programa de Triagem Neonatal para Hipotireoidismo Congênito no Nordeste do Brasil: Critérios Diagnósticos e Resultados. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 42, p. 617-627, 2008.
- RASTOGI, M. V.; LAFRANCHI, S. H. Congenital hypothyroidism. **Orphanet Journal Rare Diseases**, v. 17, n. 5, p. 1-22, 2010.
- ROBERTS, H. E.; MOORE, C. A.; FERNHOFF, P. M.; BROWN, A. L.; KHOURY, M. J. Population Study of Congenital Hypothyroidism and Associated Birth Defects, Atlanta, 1979–1992. **American Journal of Medical Genetics**, v. 71, p. 29-32, 1997.
- ROUSSEAU-MERCK, M.F.; MISRAHI, M.; LOOSFELT, H.; ATGER, M.; MILGROM, E.; BERGER, R. Assignment of the Human Thyroid Stimulating Hormone Receptor (TSHR) Gene to Chromosome 14q31. **Genomics**, v. 8, p. 233-236, 1990.
- ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplement of the Genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, 8, p. 103-106, 2008.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 3. ed. 2001.
- SETIAN N. Hypothyroidism in children: diagnosis and treatment. **Jornal de Pediatria**, v. 83, (5 Suppl) p. S209-S216, 2007.
- CALLEGARI-JACQUES, S. M.; GRATTAPAGLIA, D.; SALZANO, F. M.; SALAMONI, S. P.; CROSSETTI, S. G.; FERREIRA, M. E.; HUTZ, M. H. Historical Genetics: Spatiotemporal Analysis of the Formation of the Brazilian Population. **American Journal of Human Biology**, v. 15, p. 824 - 834, 2003.
- SRIPHRAPRADANG, C.; GERMAN, A.; DUMITRESCU, A. M.; REFETOFF, S. Consecutive Mutational Events in a TSHR Allele of Arab Families with Resistance to Thyroid Stimulating Hormone. **Thyroid**, v. 22, n. 3, p. 252-257, 2012.
- STRADER, C. D.; FONG, T. M.; TOTA, M. R.; UNDERWOOD, D.; DIXON, R. A. F. Structure and Function of G Protein-Coupled Receptors. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, p. 101-132, 1994.
- SUNTHORNTHEPVARAKUI, T.; GOTTSCHALK, M.E.; HAYASHI, Y.; REFETOFF, S. Brief report: resistance to thyrotropin caused by mutations in the thyrotropin-receptor gene. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 3, p. 155-160, 1995.
- TARGOVNIK, H. M.; CITTERIO, C. E.; RIVOLTA, C. M. Thyroglobulin Gene Mutations in Congenital Hypothyroidism. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 75, p. 311-321, 2011.
- TENENBAUM-RAKOVER, Y.; GRASBERGER, H.; MAMANASIRI, S.; RINGKANANONT, U.; MONTANELLI, L.; BARKOFF, M. S.; DAHOOD, A. M., REFETOFF, S. Loss-of-Function Mutations in the Thyrotropin Receptor Gene as a Major



Determinant of Hyperthyrotropinemia in a Consanguineous Community. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 5, p. 1706-712, 2009.

TILBURG, J. H. O. V.; SANDKUIJL, L. A.; STRENGMAN, E.; SOMEREN, H. V.; RIGTERS-ARIS, C. A. E.; PEARSON, P. L.; HAEFTEN, T. W. V.; WIJMENGA, C. A. Genome-Wide Scan in Type 2 Diabetes Mellitus Provides Independent Replication of a Susceptibility Locus on 18p11 and Suggests the Existence of Novel Loci on 2q12 and 19q13. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 5, p. 2223-2230, 2003.

TIOSANO, D.; PANNAIN, S.; VASSART, GILBERT.; PARMA, J.; GERSHONI-BARUCH, R.; MANDEL, H.; LOTAN, R.; ZAHARAN, Y.; PERY, M.; WEISS, R. E.; REFETOFF, S.; HOCHBERG, Z. The Hypothyroidism in an Inbred Kindred with Congenital Thyroid Hormone and Glucocorticoid Deficiency is Due to a Mutation Producing a Truncated Thyrotropin Receptor. **Thyroid**, v. 9, n. 9, p. 887-894, 1999.

TONACCHERA, M.; PERRI, A.; MARCO, G. de; AGRETTI, P.; BANCO, M. E.; DI COSMO, C.; GRASSO, L.; VITTI, P.; CHIOVATO, L.; PINCHERA, A. Low Prevalence of Thyrotropin Receptor Mutations in a Large Series of Subjects with Sporadic and Familial Nonautoimmune Subclinical Hypothyroidism. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 11, p. 5787-5793, 2004.

VASSART, G.; DUMONT, J. E. The Thyrotropin Receptor and the Regulation of Thyrocyte Function and Growth. **Endocrine Reviews**, v. 13, n. 3, p. 596-611, 1992.

VONO-TONIOLO, J.; KOPP, P. Thyroglobulin Gene Mutations and Other Genetic Defects Associated With Congenital Hypothyroidism. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 1, p. 70-82, 2004.

VUISSOZ, J-M.; DELADOEY, J.; BUYUKGEBIZ, A.; CEMEROGLU, P.; GEX, G.; GALLATI, S.; MULLIS, P. E. New Autosomal Recessive Mutation of the TSH-Subunit Gene Causing Central Isolated Hypothyroidism. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 9, p. 4468- 4471, 2001.

WEBER, G.; MORA, S.; PRINA CERAI, L.M.; SIRAGUSA, V.; COLOMBINI, J.; MEDAGLINI, S.; FORNARA, C.; LOCATELLI, T.; COMI, G.; CHIUMELLO, G. Cognitive function and neurophysiological evaluation in early-treated hypothyroid children. **Neurological Science**, v.21, n.5, p. 307-14, 2000.

WEISSENBACH, J.; GYAPAY, G.; DIB, C. ; VIGNAL, A.; MORISSETTE, J.; MILLASSEAU, P.; VAYSSEIX, G.; LATHROP M. A second-generation linkage map of the human genome. **Nature**, v. 359, p. 794-801, 1992.

## APÊNDICE A - Sequenciamento Direto

Para realização do sequenciamento das amostras dos marcadores internos eleitos (pacientes nº 3 e nº 21) foi inicialmente executada a reação de purificação em soluções contendo: 6µl do produto de PCR, 0,34µl de H<sub>2</sub>O Mili-Q, 0,33µl (3,3U) de EXO I (Exonuclease I), e 0,33µl (0,66U) de SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase), submetidas a um ciclo de 37°C por 30 min e 80°C por 15 min.

Em seguida foram preparadas as reações de sequenciamento com Big Dye Terminator v3.1 CycleSequencing kit, onde foram utilizados: 4,75µl de H<sub>2</sub>O Mili-Q, 2µl do produto de PCR purificado (3-10ng/µl), 1µl de oligonucleotídeo iniciador (5 pMol/µl), 1,75µl de tampão de sequenciamento e 0,5µl de Dye Termination que passaram por uma reação com ciclo inicial de 1min a 96°C, e 40 ciclos de 15s a 96°C, 15s a 50°C, e 4min a 60°C. Em seguida foi feita uma purificação por precipitação adicionando-se 1µl de Acetato de Sódio 3M pH 5,2, 1µl de EDTA 125mM pH 8,0 e 25µl de etanol absoluto, seguida por centrifugação a 4°C, 3.700 rpm por 40min. As soluções foram descartadas e foi adicionado aos poços 35µl de etanol 70%. A placa foi novamente centrifugada a 4°C, 3.700 rpm por 10 min e seca, sendo ao final adicionados 10µl de formamida e logo após executado o sequenciamento no sequenciador automático ABI3500XL (AppliedBiosystems).

Para a análise das sequências obtidas foi utilizado programa BIOEDIT 7.2.5 (HALL, 1999). Estas foram comparadas com sequências de referência dos microssatélites D14S74 e D14S606 que estão disponíveis nos bancos de dados da plataforma *National Center for Biotechnology Information* – NCBI - (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para confirmação do número de repetições e do comprimento dos fragmentos sequenciados.

### APÊNDICE B – Dados gerais do microsatélite D14S74

Pacientes	Genótipos	Controles	Genótipos
Pac. 1	13/16	Con. 1	18/18
Pac. 2	13/13	Con. 2	17/18
Pac. 3	12/14	Con. 3	15/17
Pac. 4	13/16	Con. 4	12/15
Pac. 5	14/17	Con. 5	15/15
Pac. 6	12/17	Con. 6	15/15
Pac. 7	13/13	Con. 7	16/16
Pac. 8	13/13	Con. 8	14/17
Pac. 9	12/15	Con. 9	16/18
Pac. 10	12/15	Con. 10	17/18
Pac. 11	16/19	Con. 11	13/14
Pac. 12	16/16	Con. 12	17/20
Pac. 13	15/17	Con. 13	14/16
Pac. 14	16/19	Con. 14	13/16
Pac. 15	14/17	Con. 15	15/15
Pac. 16	-	Con. 16	15/17
Pac. 17	14/20	Con. 17	13/14
Pac. 18	17/20	Con. 18	14/16
Pac. 19	15/17	Con. 19	14/14
Pac. 20	16/18	Con. 20	13/13
Pac. 21	14/17	Con. 21	13/14
Pac. 22	16/19	Con. 22	12/14
Pac. 23	15/17		
Pac. 24	16/19		
Pac. 25	14/17		

Freq. alélicas			
Alelos	Pacientes	Controles	Freq. Total (n=46)
<b>12</b>	0,083	0,045	0,065
<b>13</b>	0,166	0,136	0,152
<b>14</b>	0,125	0,204	0,163
<b>15</b>	0,104	0,204	0,152
<b>16</b>	0,187	0,136	0,163
<b>17</b>	0,187	0,136	0,163
<b>18</b>	0,02	0,113	0,065
<b>19</b>	0,083	0	0,043
<b>20</b>	0,041	0,022	0,032
<b>Total</b>	0,996	0,996	0,998

Dados gerais	
<b>Heter. Observada Pac.</b>	0,833
<b>Heter. Esperada Pac.</b>	0,877
<b>P Pac.</b>	0,000
<b>Heter. Observada Con.</b>	0,681
<b>Heter. Esperada Con.</b>	0,864
<b>P Con.</b>	0,019
<b>Heter. média obs.</b>	0,760
<b>Heter. média esp.</b>	0,871
<b>Índice de diversidade</b>	0,872 SD=0.010
<b>P geral</b>	0,000

Freq. Genotípicas			
Genótipos	Pacientes	Controles	Freq. Total (n=46)
<b>12/14</b>	0,041	0,045	0,043
<b>12/15</b>	0,083	0,045	0,065
<b>12/17</b>	0,041	0	0,021
<b>13/13</b>	0,125	0,045	0,086
<b>13/14</b>	0	0,136	0,065
<b>13/16</b>	0,083	0,045	0,065
<b>14/14</b>	0	0,045	0,021
<b>14/16</b>	0	0,09	0,043
<b>14/17</b>	0,166	0,045	0,108
<b>14/20</b>	0,041	0	0,021
<b>15/15</b>	0	0,136	0,065
<b>15/17</b>	0,125	0,09	0,108
<b>16/16</b>	0,041	0,045	0,043
<b>16/18</b>	0,041	0,045	0,043
<b>16/19</b>	0,166	0	0,086
<b>17/18</b>	0	0,09	0,043
<b>17/20</b>	0,041	0,045	0,043
<b>18/18</b>	0	0,045	0,021
<b>Total</b>	0,994	0,992	0,99

### APÊNDICE C – Dados gerais do microsatélite D14S606

Pacientes	Genótipos	Controles	Genótipos
Pac. 1	9/10	Con. 1	10/10
Pac. 2	9/12	Con. 2	9/9
Pac. 3	10/13	Con. 3	8/8
Pac. 4	8/10	Con. 4	9/9
Pac. 5	7/11	Con. 5	8/8
Pac. 6	9/12	Con. 6	8/8
Pac. 7	8/10	Con. 7	7/8
Pac. 8	8/8	Con. 8	8/10
Pac. 9	9/9	Con. 9	9/9
Pac. 10	10/11	Con. 10	10/10
Pac. 11	8/8	Con. 11	12/12
Pac. 12	9/10	Con. 12	11/11
Pac. 13	9/9	Con. 13	12/13
Pac. 14	9/9	Con. 14	11/11
Pac. 15	11/13	Con. 15	11/13
Pac. 16	-	Con. 16	12/13
Pac. 17	11/11	Con. 17	12/12
Pac. 18	12/13	Con. 18	13/13
Pac. 19	8/8	Con. 19	12/12
Pac. 20	10/11	Con. 20	11/11
Pac. 21	11/11	Con. 21	11/11
Pac. 22	10/10	Con. 22	13/13
Pac. 23	12/12		
Pac. 24	10/12		
Pac. 25	13/13		

Freq. alélicas			
Alelos	Pacientes	Controles	Freq. Total (n=46)
7	0,02	0,022	0,021
8	0,166	0,181	0,173
9	0,208	0,136	0,173
10	0,208	0,113	0,163
11	0,166	0,204	0,184
12	0,125	0,181	0,152
13	0,104	0,159	0,13
<b>Total</b>	<b>0,997</b>	<b>0,996</b>	<b>0,996</b>

Dados gerais	
<b>Heter. Observada Pac.</b>	0,541
<b>Heter. Esperada Pac.</b>	0,848
<b>P Pac.</b>	0,003
<b>Heter. Observada Con.</b>	0,227
<b>Heter. Esperada Con.</b>	0,854
<b>P Con.</b>	0,000
<b>Heter. média obs.</b>	0,391
<b>Heter. média esp.</b>	0,847
<b>Índice de diversidade</b>	0,847 SD=0,008
<b>P geral</b>	0,000

Freq. Genóticas			
Genótipos	Pacientes	Controles	Freq. Total (n=46)
7/8	0	0,045	0,021
7/11	0,041	0	0,021
8/8	0,125	0,136	0,13
8/10	0,083	0,045	0,065
9/9	0,125	0,136	0,13
9/10	0,083	0	0,043
9/12	0,083	0	0,043
10/10	0,041	0,09	0,065
10/11	0,083	0	0,043
10/12	0,041	0	0,021
10/13	0,041	0	0,021
11/11	0,083	0,181	0,13
11/13	0,041	0,045	0,043
12/12	0,041	0,136	0,086
12/13	0,041	0,09	0,065
13/13	0,041	0,09	0,065
<b>Total</b>	<b>0,993</b>	<b>0,994</b>	<b>0,992</b>