



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**ANNA BRAZILINA DA COSTA GALDINO**

**ANÁLISE DA MUTAÇÃO NA POSIÇÃO c.886C<T DO EXON 7 DO GENE DA  
TIREOGLOBULINA (TG) EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO  
CONGÊNITO DA PARAÍBA**

**Campina Grande**

**2015**

**ANNA BRAZILINA DA COSTA GALDINO**

**ANÁLISE DA MUTAÇÃO NA POSIÇÃO c.886C<T DO EXON 7 DO GENE DA  
TIREOGLOBULINA (TG) EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO  
CONGÊNITO DA PARAÍBA**

Trabalho de Conclusão de Curso em formato de artigo da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito à obtenção de título de Graduação em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Genética Humana e Médica.

Orientador: Profa. Dr<sup>a</sup>. Simone Silva dos Santos Lopes.

**Campina Grande**

**2015**

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.

G149a Galdino, Anna Brazilina da Costa.  
Análise da mutação na posição C.886c t do Exon 7 do gene da tireoglobulina (TG) em pacientes com hipotireoidismo congênito da Paraíba [manuscrito] / Anna Brazilina da Costa Galdino. - 2015.  
25 p. : il. color.  
  
Digitado.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.  
"Orientação: Profa. Dra. Simone Silva dos Santos Lopes, Departamento de Ciências Biológicas".  
  
1. Hipotireoidismo congênito. 2. Tireóide. 3. Mutação. 4. Tireoglobulina. I. Título.

21. ed. CDD 616.444

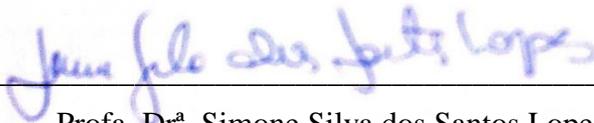
**ANNA BRAZILINA DA COSTA GALDINO**

**ANÁLISE DA MUTAÇÃO NA POSIÇÃO c.886C<T DO EXON 7 DO GENE DA  
TIREOGLOBULINA (TG) EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO  
DA PARAÍBA**

Trabalho de Conclusão de Curso em formato de artigo da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito à obtenção do título de Graduação em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Genética Humana e Médica.

Aprovada em: 04 / 12 / 2015.



---

Prof. Dr.ª. Simone Silva dos Santos Lopes.  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



---

Prof. Dr.ª Daniela Santos Pontes  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

---

Prof. Dr.º. Bruno Luiz Fonseca Chamber Reis  
Faculdade de Ciências Médicas (FCM-CG)

Com o tempo você aprende (...) que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte.

Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás.

Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores.

E você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. (...) Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar, se não fosse o medo de tentar.”

**William Shakespeare**

## AGRADECIMENTOS

O meu primeiro suspiro de agradecimento vai a Deus. Por ter sido o primeiro a acreditar que eu podia e posso ir muito mais além. E de ser tão providente em minha vida, ‘Ele que preparou tudo ao seu tempo.

À Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, professores, coordenadores e funcionários que foram responsáveis pela oportunidade, apoio e contribuição na minha formação acadêmica.

Ao meu Painho José Marcos da Costa (*in memoriam*) que, mesmo ao ter nos deixado tão cedo, não impediu que seu amor, ensinamentos nos afastasse dos princípios éticos e morais. O importante foi saber que embora fisicamente estando ausente, senti sua presença ao meu lado, nos momentos de solidão o qual muitas vezes me encontrei. A cada momento de tristeza, angústia e desânimo era ele que trazia forças pra continuar a caminhada.

A minha Mainha Maria da Paz, que mesmo ficando sem seu companheiro de vida tão cedo, buscou forças para desempenhar os dois papéis (mãe e pai). Foi o seu exemplo de mulher forte e guerreira que me espelhei e fui à busca dos meus sonhos. Obrigada, pelo amor, orações, cuidado e incentivo.

Ao meu esposo, Fábio. Poderia viver tudo isso, mas sem ele, não seria do mesmo jeito! Meu melhor presente de Deus. Sempre em minhas orações a Deus pedia que me enviasse um companheiro que pudesse suprir um pouco a falta do meu Pai. E assim Deus ouviu minhas preces. Jamais poderei mensurar com palavras o tamanho da minha gratidão e amor, por tudo que vivemos e ainda vamos viver. Te Amo!

A todos os meus irmãos, pelo amor, carinho, palavras de apoio e compreensão quando muitas vezes não me fiz presente em alguns momentos importantes.

Às minhas colegas de sala, por serem companheiras amiga e incentivadoras, mas em especial as poderosas, Andreza, Geilza e Jessica, irmãs que a biologia me deue que foram peças indispensáveis para minha caminhada, não só acadêmica, mas na vida. Carregarei vocês para toda a vida!

À professora e orientadora, Simone Silva dos Santos Lopes pela oportunidade, confiança, ensinamentos e paciência nos momentos de falhas. Serei eternamente grata.

A todos que fazem parte do Laboratório de Biologia Molecular e Genética - UEPB, pelo apoio no desenvolvimento do trabalho, em especial a Yanne, que foi uma das grandes incentivadoras, amiga e companheira nos momentos difíceis. Yanne, obrigada por sua amizade e apoio. Sei que poderei contar com você sempre!

À Patrícia, por sua parceria, ensinamentos e paciência.

A todos que de alguma forma tiveram comigo ao longo dessa caminhada. A todos que acreditaram e também os que não acreditaram que eu conseguiria chegar até aqui.

# ANÁLISE DA MUTAÇÕES NA POSIÇÃO c.886C<T DO EXON 7 DO GENE DA TIREOGLOBULINA (TG) EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO DA PARAÍBA

ANNA BRAZILINA DA COSTA GALDINO

## RESUMO

O Hipotireoidismo Congênito (HC) é uma doença endócrina com incidência estimada mundialmente de 1:3.500 crianças nascidas vivas. A doença é causada pela deficiência dos hormônios da tireóide, presentes logo nos primeiros dias de vida, podendo ser causada por uma anormalidade na embriogênese tiroideana (disgenesia) ou na biossíntese dos hormônios tireoidianos (disormonogênese), caracterizando o retardo no desenvolvimento ósseo, inabilidade intelectual, dentre outros. A disormonogênese tireoidiana está diretamente ligada às mutações no gene Tireoglobulina (TG), localizado em 8q24, que sintetiza uma glicoproteína com 660 KDa. As diferentes mutações que levam ao bócio congênito têm sido identificadas e caracterizadas no gene do TG: g.IVS3-3 C>G, p.R277X (exon 7), p.362fsX382 (exon 9), p.C1245R (exon 17), p.R1511X (exon 22), g.IVS30+1G>T, p.C1977S (exon 33), g.IVS34-1G>C, e p.R2223H (exon 38), todas associadas com o bócio simples e endêmico. Dentre essas, a mutação c.886C<T no éxon 7, que gera uma proteína truncada (pR277X), é considerada a mais frequente dentre as populações com bócio congênito. Nesse trabalho, foi analisada a mutação na posição c.886C<T do exon 7 do gene da TG em 24 pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial confirmado para HC acompanhados no Hospital Universitário Alcides Carneiros – HUAC/UFCG, no estado da Paraíba. Foram utilizadas as técnicas de RFLP e sequenciamento para identificar a ocorrência da mutação. Dentre os pacientes estudados, o paciente Q apresentou a mutação em questão, logo, a proteína TG não é completamente sintetizada, pois a mutação gera um códon de parada no aminoácido Arg277. Esse foi o primeiro caso confirmado da mutação c.886C<T na Paraíba.

**Palavras chaves:** Hipotireodismo Congênito, Mutação, Tireoglobulina.

## 1 INTRODUÇÃO

O Hipotireoidismo Congênito (HC) é uma doença endócrina com incidência mundial estimada de 1:3.500 nascidos vivos (AGRETTI et al., 2013). A doença é causada pela deficiência do hormônio da tireóide, presente logo nos primeiros dias de vida. Uma das principais causas da doença é a disgenesia, compreendendo a má formação da glândula tireoidiana durante a embriogênese; ou a disormonogênese, uma falha na síntese da produção hormonal da glândula da tireóide (RASTOGI; LAFRANCHI, 2010).

A disgenesia é responsável por 85% dos casos de HC (AGRETTI et al., 2013). A glândula da tireóide é originada de células foliculares, derivada do primórdio tireóideo e diferenciada por meio dos fatores de transcrições (TTF1-TTF2) e *pairedboxtranscriptionfactor* 8 (PAX-8). Esses fatores devem desempenhar orquestradamente suas 11 funções para o desenvolvimento da glândula, sendo fundamentais também para a migração correta da glândula e para a proliferação hormonal (VONO – TONIOLO & KOPP, 2004).

A disormonogênese da tireóide é causada principalmente por defeitos em proteínas ligadas a síntese dos hormônios tireoidianos de caráter hereditário (cerca de 15%) (AGRETTI et al., 2013). Mutações nos genes da Tireoglobulina (TG), hormônio estimulante da tireoide (TSH), da proteína Co-transporte Sódio/Iodo (NIS), da proteína Pendrina (PDS), genes do sistema THOX 1 e THOX 2 e no gene da tireoperoxidase (TPO) podem estar relacionadas com a disormonogênese da tireóide (KOPP, 2002).

A maior parte dos casos de disormonogênese tireoidiana está diretamente ligada a mutações no gene da TG. Gene esse que funciona como uma central para a síntese dos hormônios tireoidianos (RIVOLTA et al., 2005).

O HC pode acometer o indivíduo de maneira permanente ou transitória. No HC permanente, a deficiência hormonal será por toda a vida, necessitando de uma reposição hormonal no tratamento. Já no HC transitório, a deficiência ocorre nos primeiros momentos de vida e posteriormente, os níveis de hormônio são regularizados (RASTOGI; LAFRANCHI, 2010). Os indivíduos afetados pelo HC apresentam sinais e sintomas não muito específicos durante os primeiros dias de vida (PEZZUTI et al., 2009). Dentre os sintomas mais evidentes do hipotireoidismo estão: o grito rouco, constipação, icterícia prolongada, hérnia umbilical, macroglossia, bócio, retardo no desenvolvimento ósseo e do intelecto (RASTOGI; LAFRANCHI, 2010). Pelo fato dos sintomas do HC serem

imperceptíveis nos primeiros dias de vida, ressalta-se a importância da realização de uma triagem neonatal, no Brasil implantada pelo Ministério da Saúde desde 2001 (Portaria nº 822/2001) (RAMALHO, et al., 2009). Ainda assim, pode-se detectar a doença antes mesmo do nascimento por meio do histórico familiar da criança. O diagnóstico precoce e o tratamento nas primeiras semanas de vida são de fundamental importância para impedir maiores danos a criança com HC (RASTOGI; LAFRANCHI, 2010).

A TG é uma glicoproteína formada por 2768 aminoácidos, de 660 KDa, sintetizada e secretada pelas células tireoideanas dentro do lúmen folicular (VAN DE GRAAF et al., 2001).

No entanto, a biossíntese dos hormônios tireoideanos necessitam que todas as etapas sejam realizadas integralmente. A síntese da TG inicia-se com a modulação intracelular de Monofosfato de Adenosina cíclico (AMPc). Por intermédio do receptor de TSH (RTSH), localizado na membrana basal da célula, o AMPc sinaliza o início da transcrição do gene da TG, regulado pelos TTF- 1, TTF-2 e PAX-8 (RIVOLTA et al., 2006). Em outra via, o iodeto entra na célula folicular pela membrana basal por meio do transportador NIS (VAISMAN et al., 2004), após entrar na célula, outra proteína é responsável para levar o iodo até o lúmen folicular, a PDS. No lúmen o iodeto é oxidado pela ação da enzima TPO, o iodo fixa nos resíduos de tirosil da TG formando o monoiodotirosina e diiodotirosina (MIT e DIT) (RIVOLTA et al., 2006). Intercorrendo o acoplamento desses dois resíduos com o iodeto, gera uma molécula de TG iodado transportando o T4 (acoplamento de dois DITs), ou T3 (acoplamento de um MIT/DIT). O complexo TG-hormônios formados entra na célula por invaginação, dentro dos lisossomos acontece a proteólise e os hormônios tireoidianos T3 e T4 são liberados para o fluxo venoso juntamente com algumas moléculas de TG maduras. Entretanto, com insuficiência de iodo, moléculas de TG imaturo internalizam-se até o complexo de Golgi para serem aproveitadas e é identificadas na membrana pela proteína dissulfeto-isomerase (PDI). Após todo esses processos, o complexo da TG é armazenado no lúmen folicular em proteínas compactadas (figura 1) (VAN DE GRAAF et al., 2001).



O gene da TG está no locus 8q24.2 -8q24.3 do cromossomo é sintetizada como molécula de 12S que forma homodímeros de 19S e até terâmeros de 27S, em sua formação de 48 éxons separados por introns que variam no tamanho (RIVOLTA et al., 2006), e seu RNAm tem aproximadamente 8,5kb, com suas sequências heterogênia por ter a existência de 21 polimorfismos (VAN DE GRAAF et al.,2001).

Já foram identificadas 62 mutações para esse gene em humanos: 14 *splicing*(remoção dos íntrons), 12 mutações *nonsense*(um determinado codão de resíduo de aminoácido é substituído por um codão de terminação),25*missense*(mutações sem sentido), 8 deleções (perda parcial ou total de um segmento do cromossomo) e 3 SNPs (é uma variação na sequência de DNA que afeta somente uma base) (CITTERIO et al., 2013). Mas, um novo estudo realizado pelo mesmo autor CITTERIO (2015), relata uma nova mutação *splicing* no éxon 6 no gene da TG 745+1G>A (g.IVS6+1G>A), de uma família do Vietnã.

As alterações genéticas funcionais da TG são herdadas de forma autossômica recessiva de indivíduo homozigoto ou heterozigoto composto, que possui mutações diferentes nos dois alelos do indivíduo causando então a doença(AGRETTI et al., 2013).

As diferentes mutações que levam ao bócio congênito têm sido identificadas e caracterizadas no gene da TG: g.IVS3-3 C>G , p.R277X (éxon 7), p.362fsX382 (éxon 9), p.C1245R (éxon 17), p.R1511X (éxon 22), g.IVS30+1G>T, p.C1977S (éxon 33), g.IVS34-1G>C, e p.R2223H (éxon 38), todas associadas com bócio simples e endêmico (RIVOLTA et al.,2006). O primeiro caso de mutação associada à expressão anormal do TG foi descrita por Leiri et al (1991). Estudos moleculares mostraram a perda do éxon 4 no RNAm do TG, o que levou à síntese de uma proteína menor, sem um segmento peptídico de 68 aminoácidos. O resíduo de tirosina localizada na posição 130 (éxon 4) é provavelmente um sítio doador de tirosina na síntese de tiroxina. A perda do exon 4ocorreu devido a substituição de citosina por guanina na posição -3 no sítio receptor de *splice* no intron 3 (IVS3-3C>G). Outro estudo realizado com uma família, onde dois irmãos eram portadores de HC com bócio, detectou uma deleção em homozigose de um fragmento de 138 nucleotídeos na região central do RNAm da TG, causando uma degradação e diminuição dos hormônios tireoidiano (RUBIO et al., 2002).

A mutação do gene TG mais frequente entre as populações com bócio congênito é a mutação c.886C<T (p.R277X) no éxon 7. A mutação pontual é do tipo *nonsense* e foi encontrada em famílias da Argentina e em uma família do Brasil. A mutação, por sua vez,

gera uma proteína grosseiramente truncada de 276 aminoácidos diminuindo a capacidade de gerar hormônios tireoideanos (RIVOLTA et al., 2005).

Esse estudo, visou caracterizar mutação no gene da TG no éxon 7 de 24 paciente diagnosticados através de exames clínico-laboratorial com HC, acompanhados no Hospital Universitário Alcides Carneiros – HUAC/UFCG, no estado da Paraíba. Elegemos o gene TG éxon 7 para a nossa pesquisa, por ser frequente entre as populações com bócio congênito e desermonogênese. A mutação pontual p.R277X no gene TG é do tipo *nonsense* e já foi encontrada em famílias da Argentina e em uma família no Brasil (RIVOLTA et al., 2005).

Portanto, tal alteração na proteína TG justifica o mau funcionamento da glândula da tireoide dos pacientes com HC, diminuindo a secreção para o colóide de hormônios tireoideanos T3 e T4.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Tipo de estudo**

Estudo caso-controle, no qual se comparou um grupo de 24 pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial confirmado para HC (caso) e um grupo de 22 pessoas saudáveis para a doença (controle).

### **2.2 Local de estudo e amostragem**

A Pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Genética e Biologia Molecular - LGBM, localizado no complexo Três Marias no Campus I, da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, em Campina Grande – PB.

Foram obtidas amostras de sangue de 24 pacientes com diagnóstico confirmado para Hipotireoidismo Congênito provenientes da 2ª Macrorregião de Saúde do Estado da Paraíba, que são assistidos no Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC/UFCG).

Os pacientes envolvidos apresentaram glândula com tamanho e localização nomais e alguns apresentando bócio, sugerindo disormonogênese. A média de idade dos pacientes foi de 21,3 anos, possuindo faixa etária de 5 meses a 55 anos, com 52% dos indivíduos do sexo masculino.

O outro grupo utilizado como controle foi composto por 22 indivíduos, que não apresentam a disfunção de HC. O material biológico foi obtido através de punção venosa e armazenado a 4°C em tubos de coleta a vácuo contendo EDTA. As coletas foram realizadas pela equipe de endocrinologistas do HUAC.

Todos os participantes ou responsáveis legais assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a autorização de utilização das amostras de sangue, e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitario Alcides Carneiro.

### **2.3 Amostras**

As amostras do DNA genômico dos 24 pacientes com HC e os 22 controles foram recebidas em tubos de EDTA congeladas a 4°C. A extração do DNA foi realizada a partir de amostras de sangue periférico dos indivíduos, seguindo o protocolo de extração orgânica (SAMBROOK et al., 2001).

### **2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Para todas as amostras foi amplificado um fragmento de 400 pb do exon 7, do gene da TG, utilizando-se os iniciadores direto '5 TGGACCTTCCTTCCACCTTCACTG '3 e a Reverso '5CCTTCCGTCTGGCACTGCA '3 (VAN DE GRAAF *et al*, 1999).

A amplificação do DNA dos 24 paciente e os 22 controles foi realizada em um volume final para cada amostra de 25 µl contendo: 1 µl de DNA genômico, 17,56 µl de H<sub>2</sub>O, 500mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1% Triton X-100 ; 15 mM MgCl<sub>2</sub> (tampão IB), dNTP 0,2 mM, iniciador direto 0,4 pmol, iniciador reverso 0,4 pmol (unidades por µl) de Taq polimerase 1 U/L. As amplificações foram realizadas no termociclador (Veriti @96-Well Applied Biosystems) com o programa de temperatura para a desnaturação inicial por 1 min a 95 °C; com 35 ciclos de anelamento por 1 min a 60 °C e extensão por 1,5 min a 72 °C; e extensão final por 10 min a 72 °C (CITTERIO et al., 2012).

### **2.5 Polimorfismo de Fragmentos de Restrição (RFLP)**

Os produtos amplificados foram submetidos a processo de digestão enzimática utilizando a enzima de restrição AlwNI (Cail)\* (Fermentas Life Sciences). Cada reação de

digestão enzimática continha 4,4 µl de H<sub>2</sub>O ultra-pura, 0,5 µl de tampão com concentração 10x FastDigest green Buffer, 01 µl da enzima AlwNI e 5,0 µl de produto de PCR. As reações foram incubadas a 37°C por 3 horas no banho-maria. Após a digestão os paciente com a mutação p.R277X reconheceram o sítio da enzima CAGNNNCTG, produzindo dois fragmentos, um com 100pb e outro com 300pb.

## 2.6 Eletroforese gel poliacrilamida

Foram utilizados 10 µl do produto da reação de digestão enzimática que foram aplicados em um gel de poliacrilamida a 8% submetido a eletroforese em uma cuba vertical. O tampão utilizado para a corrida eletroforética foi TBE 1x (Tris-Borato-EDTA). A corrida eletroforética teve duração de 2h20min, com voltagem de 120 Volts, 11 miliAmperes e uma pré-corrida de 36 Volts de 15 min. O tamanho dos fragmentos foram caracterizados por um marcador de peso molecular de 100pb (Jena Bioscience.).

A solução de nitrato de prata foi utilizada para corar os géis e a solução reveladora de Hidróxido de sódio foi usada no final do processo, segundo o protocolo de Crestes et al. (2001).

## 2.7 Sequenciamento

Encontrando algum paciente com digestão enzimática formando dois fragmentos, um de 100pb e outro de 300, realizamos o sequenciamento das amostras amplificadas juntamente com um controle não afetado HC. Essas amostras foram sequenciadas utilizando o Analisador Genético 3500 XL (Applied Biosystems). Para cada amostra foram realizados dois sequenciamentos, um utilizando o iniciador direto e outro utilizando o iniciador reverso.

Para a reação de sequenciamento foram utilizados: 2µL do *amplicon* purificado enzimaticamente com EXOI/SAP (3-10ng/ul), 1 µL do iniciador (5pMol/ul), 1,75 µL do Tampão de Sequenciamento, 0,5 µL de BigDye (Applied Biosystems) e 4,75 µL de H<sub>2</sub>O Mili-Q, para o volume final de 10 µL. As reações foram realizadas em placas de 96-poços submetidas as condições térmicas de: desnaturação inicial de 96°C por 1 min; e 40 ciclos de desnaturação a 96°C por 1 sec, anelamento de 50°C por 15 sec, extensão de 60°C por 4 min.

As amostras foram purificadas e precipitadas utilizando 1 µL de Acetado de Sódio (3M, pH 5,2) 1 µL de EDTA (125 mM, pH 8,0) e 25 µL de etanol absoluto, que seguiram para a centrifugação a 4°C, a 3.700 rpm por 40 sec. A solução removida foi adicionada aos poços 35 µL de etanol a 70%; as amostras foram centrifugada novamente a 4°C, a 3.700 rpm por 10 sec. Após secagem da placa, foi adicionado 10 µL de formamida em cada poço e levado ao sequenciador.

## 2.8 Análises das sequências

Para a análise das sequências foram utilizados o pacote de programas Staden (STADEN et al., 2000), o programa MEGA v.6 (TAMURA et al., 2013) e a Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico – BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). No Staden foram analisados os cromatogramas, por meio do programa Trev e gerado o *contig* utilizando os programas pregap4 e gap4. O *contig* gerado foi resultado das quatro sequências (duas correspondentes ao paciente, sendo uma direta e outra reversa e duas correspondendo ao controle). O Mega 6 foi utilizado para fazer o alinhamento das sequências com o *contig*, sendo possível alinhar essas sequências e identificar a região da mutação. O programa BLAST está disponível no site do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e foi utilizado para comprovar que as sequências obtidas eram as esperadas.

## 3 RESULTADOS

A TG necessita que em sua totalidade funcional, seja perfeita sua síntese na formação dos hormônios tireoidianos, assegurar assim, que não haja o surgimento HC. Todos os 24 indivíduos passaram por uma triagem, realizando exames laboratoriais de tipagens sorológicas dos hormônios tireoidianos e exames de imagem da região tireoidiana demonstrados na tabela 1.

Tabela 1: Dados dos pacientes envolvidos na pesquisa.

Famílias	Paciente	Sexo	ID DIAG	Ultrasson	TSH <sub>inic</sub>	TSH <sub>máx</sub>	T <sub>4</sub> <sub>inic</sub>	TPO	T3 <sub>Total</sub>	TG <sub>inic</sub>	TG <sub>quant</sub>	TG <sub>qualit</sub>	L-T <sub>4</sub> <sub>inic</sub>
A	I-1	M	3A	41	220	220	0,2			214	214	87	150
	II-2	F	8A	13,7	8,2	75	3			518	552,2		150
	III-3	F	14A	18							0,1		
B	I-1	M	1A8M	9,8	60	145,8	1						150
	II-2	F											
C	I-1	F	13A		1,47	9,71	1,44			<0,2			125
	II-2	M	1A3M	21	47,8	47,8	0,08						75
	III-3	M	4A	7,5	50	50	1,32				0,1	2	75
	IV-4	M	34A		7,62		59						100
D	1	F		9,9	100							106	
E	1	F	6A7M		470		>0,3			300			62
F	1	F	45D	2,3	67,9	67,9	1,1						37,5
G	1	F	45D	normal		338,9							
H	1	M	45D		30	42,5	0,41			1,4	1,9	2	37
I	1	M	90D	1	1,13	5,68	5,68	10,2	109				100
J	1	F									17		
K	1	F		9		93							
L	1	M		augment. Do vol						<9mil diluida 1:3			
M	1	M											
N	1	M											
O	1	M	5A	5 peq para idade	1070	1070	0,5						50
P	1	F	270D	1,1 hipoplasia	7,9	99	0,7			24,7			
Q	1	M	7A	0,53 hipoplasia	54,9		0,9			<0,2			100
R	1	F	17D	Hipoplasia/Hemiagenesia	9,22	9,22	1,5			3			25

Tabela 1: Dados coletados na triagem dos paciente com HC, acompanhados no Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC/UFCG). Valores de referencia: TG <15 ng/ml, TSH 0.35 - 3.5 ul/ml T<sub>4</sub> 7,5 - 21,1 ul/ml (CITTERIO et al, 2013). O paciente Q destacado referencia ao indivíduo afetado com a mutação p.R277X encontrado na pesquisa.

Dentre as amostras dos 24 pacientes submetidas à amplificação do fragmento de interesse, seguida pela digestão enzimática, foi identificada 23 indivíduos com resultado de amplificação de 400pb referenciados pelo marcador de peso molecular de 100pb, e uma amostra cujo fragmento inicial foi digerido pela enzima AlNwI formando dois fragmentos, um com 100pb e outro com 300pb, observadas no gel de

poliacrilamida(Figura 2). Revelando assim a caracterização relatada por CITTERIO, (2013) referentes à mutação p.R277X no éxon 7 no gene da TG.

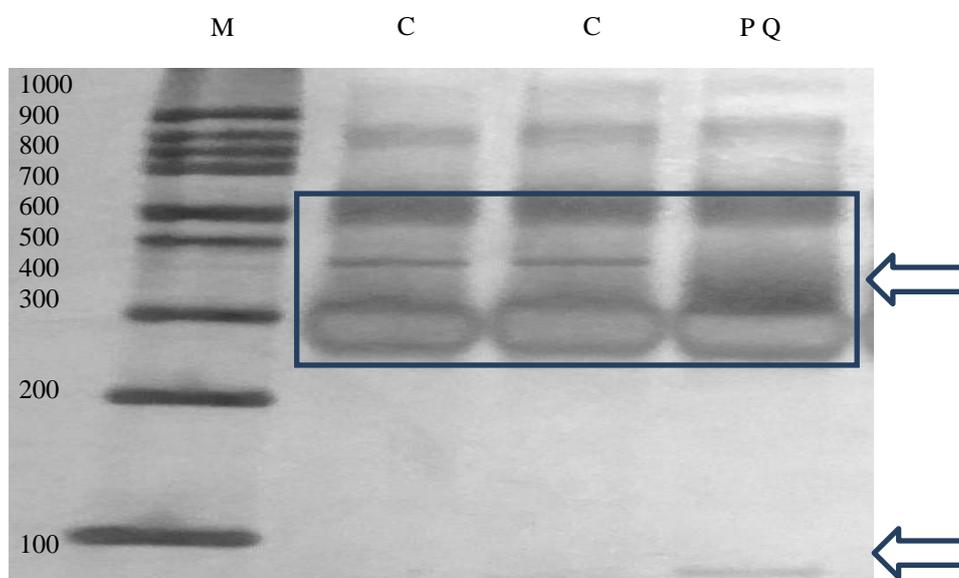


Figura 2: Eletroforese de poliacrilamida 8% visualiza a análise de RFLP(AlwNI). É mostrado o marcador (M) com peso molecular de 100bp e (C) controles. As setas mostram o paciente (P) MUTADO, amplificação dos dois fragmentos 300bp e uma banda fraca de 100bp.

Encontrado um indivíduo para a mutação, realizamos o sequenciamento das amostras do paciente e de um controle, para cada uma das amostras foram realizadas dois sequenciamentos, um utilizando o iniciador direto e outro utilizando o iniciador reverso.

A partir dos resultados obtidos pelo sequenciamento, realizamos a análise sequências em um programa de bioinformática, o pacote Staden. Nessa análise verificamos que os cromatogramas gerados pelo sequenciamento encontrava-se em um valor de confiança de 30q para serem rodados no programa e a formação dos *contigs*.

O fragmento amplificado do paciente afetado contém exatamente 409 pb, sendo o sítio da enzima(CAGATTCCG) localizado na posição 86-94 pb e a mutação encontra-se na posição 93 do fragmento. Por meio do sequenciamento foi possível identificar o nucleotídeo citosina na amostra controle e o nucleotídeo timina na amostra do Paciente mutado, comprovando a presença da mutação p.R277X no gene TG (Figura 3). A mutação está localizado no final do éxon 7, bem próximo a região intrônica do gene, a identificação da sequencia foi confirmada pelo BLAS.

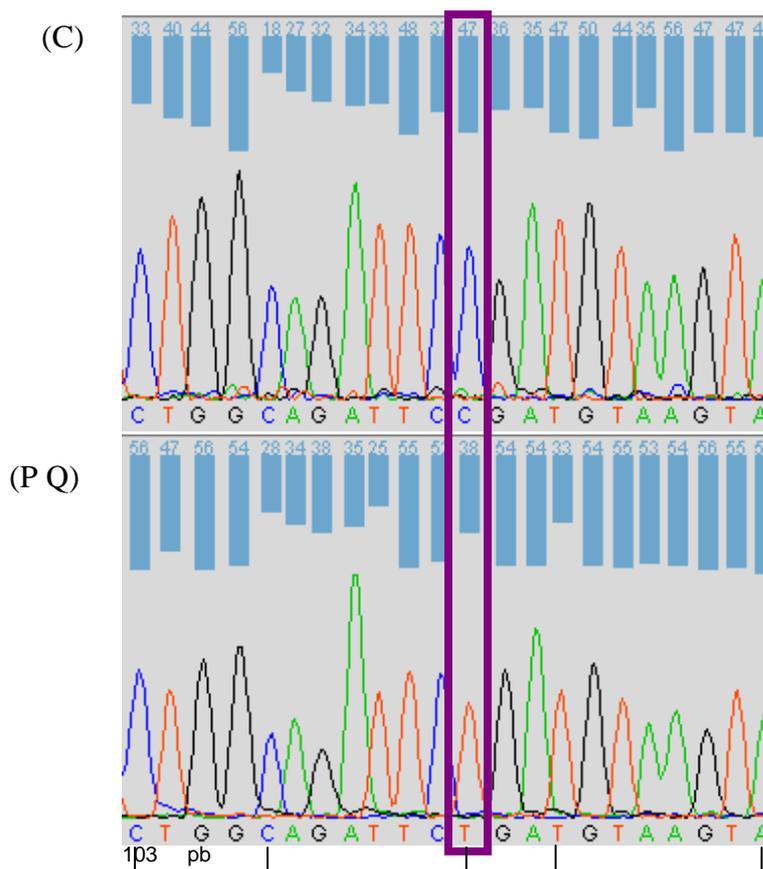


Figura 3: Cromatogramas do sequenciamento da amostra controle (C) e da amostra do Paciente Q (PQ). Retângulo roxo destaca mutação p.R277X no Paciente afetado. Sítio de restrição da enzima na posição 82-99 e polimorfismo na posição 93 pb. Barras azuis mostram os valores de confiança do sequenciamento. Figura obtida do software TREV do pacote STADEN.

### 3 DISCUSSÃO

As análises realizadas na pesquisa confirmaram a presença da mutação p.R277X em homozigoto no gene TG, em um paciente com HC de pais consanguíneos (não incluídos em nossas análises), oriundo da cidade de Ingá-PB.

Estudos relatam que indivíduos com HC por defeito na síntese de TG apresentam sintomas de bócio congênito, organificação normal de iodo, baixos níveis de TG, valores de TSH elevado, como baixos ou normais T4 e T3, hormônios tireoideanos (MEDEIROS-NETO et al, 2002; KNOBEL & MEDEIROS-NETO, 2003).

Associando o fenótipo de disormonogênese ao paciente mutado em homozigose, foi observado o baixo nível de TG sérico <0,2 ul/ml (valor de referência: <15 ng /ml),

elevação no TSH 54,9 ul/ml (valor de referência 0.35-3.5ul/ml), T40,9 ul/ml (valor de referência: 7,5-21,1ul/ml), valores referenciados pelo autores Citterio et al, (2015).

O paciente afetado não realizou o teste do pezinho após seu nascimento, tendo um diagnóstico de HC tardio, só aos sete anos de idade. Contudo, o pacientes com diagnóstico HC tardio apresenta um prejuízo significativo no seu desenvolvimento cognitivo e motor, ou seja, agravando ainda mais a doença (AVBELJet al., 2007). Outra característica fortemente associada à doença em indivíduos não tratados é o pobre crescimento e consequente baixa estatura (HASHEMIPOUR et al., 2012).

A mutação *nonsense* R277X é a mais frequente relatada no gene da TG. De um modo geral mutações no gene da TG são herdadas de forma autossômica recessiva. Os acometidos são homozigotos ou heterozigotos composto e os seus pais provavelmente serão o portador da mutação no gene (CITTERIO et al., 2012).

O autor Peteiro-Gonzalez et al., (2010) relata em um dos seus estudos que uma família com oito membros de Galicia, comunidade localizada no noroeste da Espanha, encontrou nos indivíduos as mutações p.R277X éxon 7 e g.IVS35+ 1delG éxon 35. No rastreamento, observaram-se que três deles eram afetados com o HC, heterozigotos composto, possuíam bócio e retardo mental leve, apresentando a mutação c.886C<T no éxon 7 do TG, provocando uma mudança a partir da arginina (CGA) para um códon de terminação (TGA) no resíduo 277, acontecendo um códon de parada formando uma proteína truncada p.R277X ocorrendo um CpG (metilação), região favorável a transição de C<T devido a desaminação de 5-metilcitosina acontecendo a substituição por timina, não formando um splicing alternativo. Observou-se, que no sequenciamento do paciente Q, acontece a mudança de base promove a mudança de um aminoácido para um codon de terminação, fazendo com que se fabrique uma proteína menor que o normal.

Resultados posteriores de ancestralidade confirmarão como a mutação p.R277X no éxon 7 do TG foi introduzida na população da Paraíba, pois Peteiro-Gonzalez et al., (2010), relata em seu artigo, que o haplótipo da família de Galicia e as famílias relatadas anteriormente no Brasil e na Argentina com a mesma mutação p.R277X no éxon 7 tem uma correlação de parentesco. Eles testaram dezenove marcadores, só um haplótipo não correspondeu entre os marcadores utilizados nos membros das famílias de Galicia, levantando assim a possibilidade de um antepassado com o alélo mutado ter sido introduzido na população da América do Sul, por esses países abrigarem uma grande população de imigrantes dessa região da Europa.

## 4 CONCLUSÃO

O rastreamento realizado nos 24 pacientes do estado da Paraíba envolvidos na pesquisa, apontou em um deles a presença da mutação p.R277X, frequência para amostra estudada 4.16%, que resulta em uma proteína truncada no gene da TG, impedindo então que a síntese dos hormônios tireoidiano do paciente seja eficiente. Esta análise pode contribuir para o aconselhamento genético dos pacientes provenientes desta região e do estado e que provavelmente tenham a mesma origem genética.

Análises futuras de ancestralidade poderão confirmar como esse alelo fora introduzido na população do estado da Paraíba.

### **ANALYSIS OF MUTATION IN c.866<T POSITION OF EXON 7 OF THE THYROGLOBULIN GENE IN PATIENTS WITH CONGENITAL HYPOTHYROIDISM IN PARAÍBA**

#### **ABSTRACT**

The Congenital Hypothyroidism (CH) is an endocrine disease with an estimated incidence worldwide of 1: 3,500 live births. The disease is caused by thyroid hormones deficiency, present in the first days of life, can be caused by an abnormality in thyroid embryogenesis (dysgenesis) or in the biosynthesis of thyroid hormones (dyshormonogenesis), characterizing the delay in bone development, inability to intellect, among others. Thyroid dyshormonogenesis is directly linked to gene thyroglobulin (TG) mutations, located into 8q24, which synthesizes a glycoprotein with 270KB. The different mutations leading to congenital goiter have been identified and characterized in the TG gene: g.IVS3-3 C> G, p.R277X (exon 7) p.362fsX382 (exon 9), p.C1245R (exon 17) , p.R1511X (exon 22), g.IVS30 + 1G> T, p.C1977S (exon 33), g.IVS34-1G> C, and p.R2223H (exon 38), all associated with simple and endemic goiter. Among these, c.886C <T mutation in exon 7, which generates a truncated protein (pR277X), is considered the most frequent among populations with congenital goiter. In this work, the mutation in c.886C<T position of exon 7 of the TG gene was analyzed in 24 patients with clinical and laboratory diagnosis confirmed for CH followed at University Hospital Alcides Carneiro HUAC/UFCG, in

Paraíba. The RFLP and sequencing techniques were used to identify the occurrence of mutation. Among the patients studied, the Q Patient presented the mutation in question, so the TG protein is not completely synthesized, because the mutation creates a stop codon at amino acid Arg277. This was the second confirmed case of the c.886C <T mutation in Brazil.

**Keywords:** Congenital hypothyroidism, Mutation, Thyroglobulin.

## REFERÊNCIAS

AGRETTI P.; DE MARCO G.; DI COSMO C.; FERRARINI E.; MONTANELLI L.; BAGATTINI B.; VITTI P.; TONACCHERA M. Congenital Hypothyroidism Caused by a Novel Homozygous Mutation in the Thyroglobulin Gene. **Eur J Pediatr**, Pisa, v. 172(7): p. 959-64, Mai, 2013.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology** 215: 403-410, (1990).

ANDROVANDI C., NUNES M. L. T., Avaliação intelectual de escolares com Hipotireoidismo Congênito, **Aletheia Conoas** n. 20, jul./dez. 2004p. 55-64.

AVBELJ, M.; TAHIROVIC, H.; DEBELJAK, M.; KUSEKOVA, M.; TOROMANOVIC, A.; KRZISNIK, C.; BATTELINO, T. High prevalence of thyroid peroxidase gene mutations in patients with thyroid dyshormonogenesis. **European Journal of Endocrinology**. v.156, n.5, p.511–519, 2007.

CANGUL H.; BOELAERT K., DOGAN M., SAGLAM Y., KENDALL M., BARRETT T. G., MAHER E. R. Novel truncating thyroglobulin gene mutations associated with congenital hypothyroidism, *Eur J Pediatr* (2013) 172:959–964, Published online: 15 August 2013, **Springer Science+Business Media**, New York 2013.

CITTERIO C. E.; MACHIAVELLI G. A.; MIRAS M. B.; LAURA GRUÑEIRO-PAPENDIECK L. G.; LACHLAN K.; SOBRERO G.; CHIESA A.; WALKER J.; MUÑOZ L.; TESTA G.; BELFORTE F. S.; SARMIENTO R. G.; RIVOLTA M. C.; TARGOVNIK H. M. New insights into thyroglobulin gene: Molecular analysis of seven novel mutations associated with goiter and hypothyroidism, **Molecular and Cellular Endocrinology**, 365 (2013) 277–291, 2012.

CITTERIO, C. E.; MORALES, C. M.; BOUHOURS-NOUET, N.; MACHIAVELLI, G. A.; BUENO, E.; GATELAIS, F.; COUTANT, R.; GONZALEZ-SARMIENTO, R.; RIVOLTA, C. M.; TARGOVNIJ, H. M. Novel compound heterozygous *Thyroglobulin* mutations c.745+1G>A/c.7036+2T>A associated with congenital goiter and

hypothyroidism in a Vietnamese family. Identification of a new cryptic 5' splice site in the exon 6. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 404 (2015) 102-112, 2014.

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. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v.92, n.7, p.2816–2820, 2007.

HASHEMIPOUR, M.; SOHEILPOUR, F.; KARIMIZARE, S.; KHANAHMAD, H.; KARIMIPOUR, M.; AMINZADEH, S.; KOKABEE, L.; AMINI, M.; HOVSEPIAN, S.; HADIAN, R. Thyroid Peroxidase Gene Mutation in Patients with Congenital Hypothyroidism in Isfahan, Iran. **International Journal of Endocrinology**. v. 2012, n.717283, p. 1-6, 2012.

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

KNOBEL M & MEDEIROS-NETO, G.; An outline of inherited disorders of the thyroid hormone generating system. *Thyroid*. 2003 Aug;13(8):771-801. Review

KREISNER E., SCHERMANN L., CAMARGO E. N., GROSS J.L., Predictors of intellectual outcome in a cohort of Brazilian children with congenital hypothyroidism, **Clinical Endocrinology** (2004) 60, 250–255, Received 1 May 2003; returned for revision 12 June 2003; finally revised 6 October 2003; accepted 13 November 2003.

MACHIAVELLI, A. G.; CAPUTO, M.; RIVOLTA, C. M.; OLCESE, M. C.; PAPENDIECK, G. L.; CHIESA, A.; SARMIENTO, R. G.; TARGOVNIK, M.; Molecular analysis of congenital goitres with hypothyroidism caused by defective thyroglobulin synthesis. Identification of a novel c.7006C>T [p.R2317X] mutation and expression of minigenes containing nonsense mutations in exon 7. **Clinical Endocrinology** (2010) 72, 112–121.

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. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.57, n.3, p.184-192, 2013.

MAHJOUBI, F.; MOHAMMADI, M. M.; MONTAZERI, M.; AMINII, M.; HASHEMIPOUR, M. Mutations in the gene encoding paired box domain (PAX8) are not a frequent cause of congenital hypothyroidism (CH) in Iranian patients with thyroid dysgenesis. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 54, n. 6, p. 555-559, 2010.

MEDEIROS-NETO, G.; KNOBEL, M.; DeGroot LJ. Genetic disorders of the thyroid hormone system. In: Baxter John D, editor. *Genetics in Endocrinology*. Philadelphia: *Lippincott Williams and Wilkins*; 2002. p. 375–402.

PERONE, D.; TEIXEIRA, S. S.; CLARA, S. A.; SANTOS, D. C. dos; NOGUEIRA, C. R. Aspectos Genéticos do Hipotireoidismo Congênito. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.48, n.1, p.62-69, 2004.

PETEIRO-GONZALEZ, D.; LEE, J.; RODRIGUEZ-FONTAN, J.; CASTRO-PIEDRAS, I.; CAMESELLE-TEJEIRO, J.; BEIRAS, A.; BRAVO, S. B.; ALVAREZ, C. V.; HARDY, D. M.; TARGOVNIK, H. M.; ARVAN, P.; LADO-ABEAL, J. New Insights into Thyroglobulin Pathophysiology Revealed by the Study of a Family with Congenital Goiter. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Espanha, v. 95, n. 7, p. 3522–3526, 2010.

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

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. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.52, n.42, p.617-627, 2008.

RASTOGI, M. V.; LAFRANCHI, S. H. Congenital hypothyroidism. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, Oregon, v. 5: p. 17. 2010.

RIVOLTA, C. M.; MOYA, C. M.; GUTNISKY, V. J.; VALERIA, V.; MIRALLES-GARCIA, J. M.; GONZALEZ-SARMIENTO, R.; TARGOVNIK, H. M.. A New Case of Congenital Goiter with Hypothyroidism Caused by a Homozygous p.R277X Mutation in the Exon 7 of the Thyroglobulin Gene: A Mutational Hot Spot Could Explain the Recurrence of This Mutation. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Buenos Aires-Argentina, 90(6):3766–3770, 2005.

RIVOLTA, C. M.; TARGOVNIK, H. M.; Molecular advances in thyroglobulin disorders. **Clin. Chim. Acta.**2006: 374(1-2):8-24.

RUBIO, I. G. S.; ;KNOBEL, M.; NASCIMENTO, A. C.; SANTOS, C. L.; JUSSARA V. TONIOLO, J. C.; MEDEIROS-NETO, G. Hipotireoidismo Congênito: Recentes Avanços em Genética Molecular. **ArqBrasEndocrinolMetab**, São Paulo, v. 46(4) p. 391-401, Ago. 2002.

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

STADEN, R.; BEAL, K. F.; BONFIELD, J. K. The Staden package 1998. **Methods Molecular Biology** 132: 115–130, 2000.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR. S.; (2013) **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0**. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729, 2013.

TARGOVNIK H. M.; CITTERIO C. E.; RIVOLTA C. M. Thyroglobulin gene mutations in congenital hypothyroidism. **Horm Res Paediatr**, Buenos Aires, v. 75(5): p. 311-21, Mar. 2011.

VAN DE GRAAF, S.A.R., Ris-Stalpers, C., Veenboer, G.J.M., Cammenga, M., Santos, C., Targovnik, H.M., de Vijlder, J.J.M., Medeiros-Neto, G., 1999. A premature

stopcodonin thyroglobulin mRNA results in familial goiter and moderate hypothyroidism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 84, 2537–2542.

VAN DE GRAAF, S.A.R., Ris-Stalpers, C., Pauws, E., Mendive, F.M., Targovnik, H.M., de Vijlder, J.J.M., 2001. Up to date with human thyroglobulin. **J. Endocrinol.** 170, 307–321.

VAISMAN, M.; ROSENTHAL, D.; CARVALHO, D. P. Enzimas Envolvidas na Organificação Tireóideana do Iodo. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.48, n.1, p.9-15, 2004  
VONO-TONIOLO, J.; KOPP, P. Thyroglobulin gene mutations and other genetic defects associated with congenital hypothyroidism. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.48, n.1, 2004.