Viviane Lyrio do Valle de Pardo

Rastreamento e estudo funcional de
mutações no gene da tireoglobulina
associadas a bócio congênito e
hipotireoidismo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
de título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Endocrinologia
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Medeiros-Neto
Co-orientadora: Dra. Ileana Gabriela Sanchez
Rubio

São Paulo
2007

Dedico esta tese aos amores da minha vida: Daniel, meus queridos pais e irmã.

Agradeço imensamente a vocês pelo apoio e amor incondicional, os quais foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela força, compreensão, e principalmente, pelo carinho que vocês me deram ao longo deste período. Tenho certeza que sem vocês ao meu lado, a realização deste sonho seria impossível.

AGRADECIMENTOS

Ao longo deste trabalho tive a felicidade de conhecer e contar com diversas pessoas maravilhosas que sempre estiveram dispostas a me ajudar a seguir em frente e realizar este sonho. Hoje, para a minha felicidade, não posso mais chamar estas pessoas simplesmente de colaboradores, e sim de AMIGOS. E é a vocês amigos, que agradeço com todo carinho tudo que fizeram por mim, pois este trabalho tem um pedacinho de cada um de vocês.

A Deus, por ter me dado saúde, paciência e perseverança para alcançar meu objetivo.

Ao meu marido, pelo companheirismo, força, incentivo, compreensão e carinho, mas, sobretudo por seu amor.

Aos meus queridos e amados pais, por tudo que vocês fizeram e fazem por mim até hoje. Obrigada pelas palavras de incentivo, apoio, carinho, e principalmente pelo amor incondicional de vocês.

À minha irmã, que durante a maior parte do desenvolvimento desta tese estive distante, mas mesmo assim, sempre torceu incansavelmente por mim.

Ao Dr. Geraldo, meu orientador e quem muito admiro, por ter confiado a mim o desenvolvimento desta tese. E principalmente pela oportunidade de aprender com sua vasta experiência e sabedoria.

À Ileana, minha amiga e co-orientadora, e quem me apresentou ao fantástico mundo da biologia molecular. Muito obrigada por tudo o que você fez por mim.

Tenho certeza que sem você por perto, me auxiliando, seria impossível realizar este trabalho. Tudo o que sei de biologia molecular devo a você.

As minhas queridas amigas: Solange, Roberta, Ana Luiza, Paola e Kátia. Obrigada por toda ajuda, apoio e incentivo. E principalmente, muito obrigada por todos os momentos divertidíssimos que passamos juntas.

Ao Dr. Peter Kopp, pela parceria, ajuda e apoio. E principalmente por ter me recebido tão bem em seu laboratório, onde pude aprender algumas técnicas utilizadas neste trabalho.

Ao Dr. Hector Targovnik e a Dra. Carina Rivolta, pela colaboração, ajuda e apoio.

Ao Dr. Eduardo Tomimori e a Dra. Rosalinda Camargo, pela amizade e inúmeras sugestões.

À Cristina Takami Kanamura, pela ajuda na realização da técnica de imunohistoquímica.

Ao Marcelo Alves Ferreira, pela ajuda na realização da técnica de microscopia imunoeletrônica.

A todos os amigos do LIM-25, pela amizade e ajuda na elaboração desta tese.

Ao Dr. Antonio Carlos Chagas, Dra. Vera Dias e ao Dr. Hermínio de Oliveira pela colaboração na coleta dos pacientes envolvidos nesta tese.

A todos meus amigos, que de alguma forma sempre me ajudaram.

Ao Dr. Meyer Knobel e a Dra. Suemi Marui, pela ajuda e colaboração.

À Maria Silvia Cardia pela ajuda nas dosagens hormonais dos pacientes.

À FAPESP e ao Indatir pelo apoio financeiro.

"Morre lentamente quem passa os dias queixando-se da má sorte ou da chuva incessante, desistindo de um projeto antes de iniciá-lo, não perguntando sobre um assunto que desconhece e não respondendo quando lhe indagam o que sabe".

Pablo Neruda - CHL, 1904-1973.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos periódicos de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Resumo	
Summary	
I. INTRODUÇÃO.....	1
Síntese dos hormônios tireoideanos.....	1
Hipotireoidismo congênito.....	4
Tireoglobulina: Estrutura, expressão e regulação.....	5
Mutações no gene da TG em animais.....	10
Mutações no gene da TG em humanos.....	11
Mutações <i>missense</i>	12
Mutações em sítios de <i>splice</i>	13
Mutações <i>nonsense</i>	13
Deleções e inserções.....	14
Polimorfismos do gene da TG em humanos.....	16
II. OBJETIVOS.....	19
III. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	20
Pacientes.....	20
Indivíduos controles.....	27
Dosagens hormonais.....	27
Teste de estímulo com TSH humano recombinante.....	28
Extração de DNA.....	28
Amplificação pela reação da polimerase em cadeia.....	29
Sequenciamento.....	31
Detecção de polimorfismos e microsatélites.....	31
Coleta de amostras de tecido tireoideano.....	32
Extração de RNA total.....	32
Quantificação do RNA total e do DNA.....	33
Síntese de DNA complementar.....	33
Quantificação da expressão gênica por RT-PCR quantitativo em tempo real.....	33
Plasmídeos contendo o cDNA da TG.....	34

Cultura celular.....	35
Transfecção.....	36
Extração de proteínas.....	37
Quantificação de proteínas totais.....	37
Dosagem de tireoglobulina.....	38
Eletroforese de proteína e hibridização.....	38
Imunohistoquímica e microscopia.....	40
Microscopia eletrônica e microscopia eletrônica por imunofluorescência.....	41
Análise da estrutura secundária da proteína mutada.....	41
IV. RESULTADOS.....	42
Confirmação do defeito de síntese de tireoglobulina.....	42
Alterações genéticas no gene da TG.....	42
Efeito fundador.....	55
Estudo funcional da mutação A2215D.....	56
Análise da proteína <i>in silico</i>	56
Avaliação da expressão da TG mutada em células de mamífero.....	58
Avaliação quantitativa da secreção da tireoglobulina.....	59
Estudo da expressão da TG mutada em tecido tireoideano.....	60
Quantificação da expressão gênica em tecido tireoideano.....	62
Análise da localização da TG no tecido tireoideano.....	63
Microscopia eletrônica.....	64
Microscopia eletrônica por imunofluorescência.....	65
V. DISCUSSÃO.....	67
VI. CONCLUSÕES.....	79
VII. REFERÊNCIAS.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

TG	tireoglobulina
TSH	hormônio estimulante da tireóide
T3	triiodotironina
T4	tiroxina
MIT	monoiidotirosina
DIT	diiidotirosina
TPO	tireoperoxidase
TTF-1	fator de transcrição tireoideano 1
TTF-2	fator de transcrição tireoideano 2
Pax-8	<i>paired box transcription factor 8</i>
RTSH	receptor de TSH
NIS	simportador sódio/iodo
DUOX	<i>dual oxidase</i>
TSHhr	hormônio estimulante da tireóide humano recombinante
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
ERSD	doenças de acúmulo do retículo endoplasmático (<i>endoplasmic reticulum storage disease</i>)
UPR	resposta a proteínas com alteração estrutural (<i>unfolded protein response</i>)
AMP _c	adenosina monofosfato cíclica
PCR	reação de polimerase em cadeia
AChE	Acetilcolinesterase
RER	retículo endoplasmático rugoso
Indel	inserção/deleção
SNP	polimorfismos de base única (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
UA	unidades arbitrárias
et al.	e outros/colaboradores

RESUMO

Pardo, VLV. Rastreamento e estudo funcional de mutações no gene da tireoglobulina associadas a bócio congênito e hipotireoidismo (tese). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Introdução: O hipotireoidismo congênito possui prevalência de 1/4000 crianças nascidas vivas e pode ser causado por disgenesia tireoideana (80% dos casos) ou por defeitos de síntese hormonal (20% restantes). A disormonogênese tem sido associada a mutações nos genes: tireoglobulina, simportador sódio/iodo, tireoperoxidase, *dual oxidase 2*, e pendrina. A tireoglobulina é uma glicoproteína de 660KDa e funciona como matriz para a síntese dos hormônios tireoideanos. Até o momento 38 mutações inativantes, associadas a bócio e hipotireoidismo, foram identificadas no gene da tireoglobulina. **Objetivos:** Este estudo visou caracterizar mutações no gene da tireoglobulina em 13 pacientes brasileiros com bócio e hipotireoidismo congênito e verificar o efeito funcional da mutação A2215D identificada neste estudo. **Casuística e Métodos:** Foram estudados 13 pacientes com hipotireoidismo congênito por possível defeito de síntese de tireoglobulina. Foi utilizado DNA de sangue periférico de todos os pacientes e amostra de tecido da paciente portadora da mutação A2215D. Os métodos utilizados foram: amplificação e sequenciamento dos 48 exons e das junções exon/intron, transfecção de células de mamífero com plasmídeos contendo o cDNA da tireoglobulina mutada e não mutada, eletroforese de proteínas e hibridização com anticorpo específico, dosagem de tireoglobulina por fluoroimunoensaio indireto, quantificação de RNAm por PCR quantitativo em tempo real, imunohistoquímica, microscopia por coloração de hematoxilina/eosina e microscopia eletrônica e imunoelétrica. **Resultados:** O defeito de síntese de tireoglobulina nos pacientes foi confirmado pela ausência de elevação do valor da tireoglobulina sérica 24 e 48hs após a aplicação de 0,45mg de TSH humano recombinante. No gene da tireoglobulina foram identificadas cinco mutações, sendo duas novas (Q2142X e IVS46-1G>A) e três já descritas na literatura (R277X, IVS30+1G>T e A2215D); 19 polimorfismos e 13 alterações em introns. Doze dos treze pacientes apresentaram mutações bialélicas (homozigose ou em heterozigose composta). O estudo funcional em células de mamíferos revelou diminuição da secreção da proteína mutada e no tecido do paciente portador da mutação A2215D mostrou: localização intracelular da tireoglobulina com ausência quase total no colóide; retículo endoplasmático rugoso de volume extremamente aumentado, presença de tireoglobulina dentro do retículo endoplasmático rugoso e baixo conteúdo de RNAm de tireoglobulina e da própria proteína. Também foram verificados baixo conteúdo de RNAm de genes tireoideanos (TPO, TTF1, PAX-8, NIS, receptor de TSH). **Conclusão:** Todas as mutações identificadas neste estudo explicaram o hipotireoidismo congênito diagnosticado nos pacientes. A mutação A2215D promoveu a retenção da proteína mutada dentro do retículo endoplasmático rugoso e diminuiu sua secreção para o colóide, ocasionando grave defeito de síntese hormonal e hipotireoidismo. A tireoglobulina endógena portadora da mutação A2215D poderia atuar como regulador da função tireoideana via supressão da expressão dos fatores de transcrição importantes na fisiologia da tireóide.

Decritores: Hipotireoidismo congênito, tireoglobulina, mutação.

SUMMARY

Pardo VLV. Screening and functional analysis of thyroglobulin gene mutations de mutações related to congenital goiter and hypothyroidism [thesis]. Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2007.

Introduction: Congenital hypothyroidism is one of the most common hereditary endocrine disorders, which affects 1:4000 newborns. Congenital hypothyroidism is caused by thyroid gland dysgenesis (80%) or inborn errors of thyroid hormone synthesis (20%). Genetic defects in thyroglobulin, pendrin, thyroperoxidase, dual oxidase 2, symporter sodium/iodine have been associated to dysmorphogenesis. Thyroglobulin is a large glycoprotein that functions as the matrix for thyroid hormone synthesis. At least 38 mutations in the TG gene have been identified in patients with thyroid dysmorphogenesis. **Objectives:** The aims of this study were to identify thyroglobulin gene mutations associated with congenital hypothyroidism in 13 Brazilian patients, and to determine the functional effect of the mutation A2215D identified in this study. **Patients and methods:** Thirteen patients with congenital hypothyroidism due to defective thyroglobulin synthesis were included. Peripheral blood DNA from all the patients and one thyroid tissue sample from a patient with the A2215D mutation were collected. Thyroglobulin exons and exons/introns borders were amplified by PCR and sequenced. Mammalian cells were transfected with expression vectors encoding mutated and non-mutated thyroglobulin cDNA. Immunoblots, determination of thyroglobulin concentrations, real time PCR to quantify mRNA expression, immunohistochemical analysis, hematoxylin-eosin staining and electronic and immunogold microscopy were performed. **Results** Abnormal thyroglobulin synthesis and secretion was confirmed by the absence of a serum thyroglobulin elevation 24 and 48 hours after the stimulation with recombinant human TSH (0.45 mg). Molecular analysis revealed five mutations in the thyroglobulin gene, 2 novel (Q2142X and IVS46-1G>A) and three previously described mutations (R277X, IVS30+1G>T and A2215D); 19 polymorphisms and 13 intronic alterations. Biallelic mutations (homozygous or compound heterozygous) in the thyroglobulin gene were identified in twelve of thirteen patients. Functional studies in mammalian cells showed low secretion of the mutated thyroglobulin (A2215D). The complete analysis of the thyroid tissue from a patient with the A2215D mutation revealed: mutant thyroglobulin in the follicular cell but not in the lumen, marked dilatation of the endoplasmic reticulum, thyroglobulin immunopositivity in the endoplasmic reticulum and low concentration of thyroglobulin protein and mRNA. Furthermore, low mRNA levels of thyroid genes (TPO, TTF1, PAX-8, NIS, receptor de TSH) were detected. **Conclusions:** All the identified thyroglobulin gene mutations explained the congenital goiter hypothyroidism of the patients. The mutation A2215D promoted the retention of the mutant thyroglobulin in the endoplasmic reticulum, decreased the thyroglobulin secretion to the colloid resulting in an impairment of thyroid hormone synthesis and congenital hypothyroidism. The endogenous A2215D mutant thyroglobulin could be considered a regulator of follicular function mediated by the transcriptional suppression of thyroid genes.

Decriptors: Congenital hypothyroidism, thyroglobulin, mutations.

I. INTRODUÇÃO

Síntese dos hormônios tireoideanos

A síntese dos hormônios tireoideanos requer a integridade de um complexo sistema protéico e de uma seqüência de etapas (Van Herle et al, 1979; Dunn et al, 2000; Taurog, 2000; Arvan et al, 2005; Kopp, 2005). A proteína mais abundante expressa na glândula tireoideana é a tireoglobulina (TG), a qual serve como matriz para a síntese dos hormônios tireoideanos e para estocar a forma inativa do iodo (Rivolta et al, 2006).

O iodo entra na célula folicular tireoideana através do simportador sódio/iodo (NIS) localizado na membrana basolateral da célula que está acoplado à geração de ATP (Dohan et al 2000). Após a entrada na célula, a pendrina (PDS) é a responsável por transportar o iodo até o lúmen folicular (Coyle et al, 1996; Sheffield et al, 1996). Rodriguez et al (2002) identificaram um segundo transportador de iodo na membrana apical denominado hAIT (*human Apical Iodine Transporter*). Os passos seguintes para a síntese dos hormônios tireoideanos são a oxidação e o acoplamento do iodo nos resíduos tirosil da TG por ação da enzima tireoperoxidase (TPO) (Libert et al, 1987; Kimura et al, 1987; Kimura et al, 1989). Esta enzima é ativa na presença do catalisador peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é gerado por um complexo sistema formado por membros da família NADPH oxidase: DUOX-1 e DUOX-2, DUOXA1 e DUOXA2 (De Deken et al, 2000; Grasberger et al, 2006). Recentemente, a proteína chamada EFP1 (*EF-hand binding protein 1*) foi identificada como participante do complexo sistema de geração de H_2O_2 (Wang et al, 2005). A ligação do iodo oxidado (iodeto) nos resíduos tirosil da tireoglobulina forma monoiodotirosina (MIT) ou diiodotirosina (DIT). O acoplamento de dois DITs origina T4 e de um MIT com um

DIT sintetiza T3 (Taurog, 2000). O complexo TG-hormônio formado entra na célula por invaginação, e dentro dos lisossomos ocorre a proteólise para liberação dos hormônios tireoideanos (T3 e T4) na corrente sanguínea, juntamente com algumas moléculas de TG madura. As moléculas de MITs e DITs que não se ligaram para formar hormônio tireoideano sofrem a ação da enzima desalogenase 1 (DEHAL 1), que libera o iodo para ser reaproveitado pela célula (Gnidehou et al, 2004) (Figura 1).

Figura1: Representação esquemática da síntese dos hormônios tireoideanos. 1) o hormônio estimulante da tireóide (TSH) liga-se em seu receptor de membrana e estimula a síntese de RNA mensageiro (RNAm) da TG no núcleo da célula; 2) o RNAm sintetizado migra para o retículo endoplasmático rugoso (RER), onde ocorre a síntese proteica. Após a tradução, a proteína sofre intenso controle de qualidade realizado pelas chaperonas; 3) a TG migra do RER para o complexo de Golgi, já como um dímero, onde se completa o processamento pós-traducional (glicosilação); 4) a TG dimérica ainda imatura migra para o lúmen folicular por invaginação. A enzima TPO na presença de H_2O_2 , sintetizado pelo sistema DUOX, promove a oxidação e o acoplamento do iodo no resíduo tirosil da TG para a formação de MIT e DIT. Ainda no lúmen folicular, ocorre a síntese dos hormônios tireoideanos (T3 e T4) pela junção de MIT e DIT; 5) o complexo TG-hormônio entra novamente na célula e sofre proteólise para a liberação dos hormônios tireoideanos na corrente sanguínea; 6) nesta etapa, a enzima DEHAL 1 retira o iodo não utilizado na síntese dos hormônios para ser reaproveitado pela célula; 7) moléculas de TG madura são liberadas na corrente sanguínea juntamente com os hormônios tireoideanos.

L: lisossomo; **M:** mitocôndria; **R:** ribossomos; **P:** peroxissomo; **G:** complexo de Golgi; **ER:** retículo endoplasmático rugoso; **N:** núcleo; **E:** endossomo.

Hipotireoidismo congênito

O hipotireoidismo congênito (HC) possui prevalência de 1/4000 crianças nascidas vivas (Medeiros-Neto et al, 2002; Knobel & Medeiros-Neto, 2003). Pacientes com a síndrome podem ser divididos em dois grupos: sem bócio (disgenesia tireoideana) e com bócio (disormonogênese). A disgenesia, a qual acontece em 80% dos casos, resulta da ectopia (quando o tecido tireoideano se localiza na base da língua ou em outra posição ao longo do trato tireoglosso), da agenesia (ausência de tecido tireoideano) ou da hipoplasia da glândula (glândula cervical com menor tamanho). Na minoria dos pacientes com disgenesia tireoideana, o HC foi associado a mutações em genes responsáveis pelo desenvolvimento ou crescimento das células foliculares tireoideanas: 1) fator de transcrição tireoideano 1 (TTF-1) (Iwatani et al, 2000; Pohlenz et al, 2002a; Krude et al, 2002) 2) fator de transcrição tireoideano 2 (TTF-2) (Clifton-Bligh, 1998); 3) *Paired Box transcription factor 8* (PAX-8) (Macchia et al, 1998; Vilain et al, 2001; Congdon et al, 2001; Meeus et al, 2004); 4) hormônio estimulante da tireóide (TSH) (Pohlenz et al, 2002b; Borck et al, 2004) e 5) gene receptor de TSH (rTSH) (Sunthornthepvarakul et al, 1995; Tonacchera et al, 2000). A disormonogênese ou defeito de síntese hormonal acontece nos 20% restantes e tem sido associada a mutações nos genes: 1) simportador sódio/iodo (NIS) (Miki et al 1997; Pohlenz et al, 1997; Pohlenz et al, 1998; Dohán et al, 2000); 2) tireoglobulina (TG) (Targovnik et al, 1989; Targovnik et al, 1990; Ieiri et al, 1991; Targovnik et al, 1993; Medeiros-Neto et al, 1993; Targovnik et al, 1995; Medeiros-Neto et al, 1996; Targovnik et al, 1998; van de Graaf et al, 1999a; van de Graaf et al, 1999b; Hishinuma et al, 1999; Targovnik et al, 2001; Caron et al, 2003; Gutnisky et al, 2004; Rivolta et al, 2005; Mendive et al,

2005; Hishinuma et al, 2005; Vono-Toniolo et al, 2005; Kitanaka et al, 2006; Alzahrani et al, 2006; Hishinuma et al, 2006; Caputo et al, 2007); 3) tireoperoxidase (TPO) (Abramowicz et al, 1992; Bikker et al, 1994; Bikker et al, 1995; Bikker et al, 1996; Bakker et al, 2000; Bakker et al, 2001; Rivolta et al, 2003); 4) *dual oxidase 2* (DUOX-2) (Moreno et al, 2002; Vigone et al, 2005; Varela et al, 2006) e 5) pendrina (PDS) (Kopp, 2000; Borck et al, 2003). Essas mutações originam um espectro heterogêneo de bócio congênito, transmitido de maneira autossômica recessiva (Knobel & Medeiros-Neto, 2003; Rivolta et al, 2006).

Pacientes com HC por defeito na síntese de TG apresentam bócio congênito, hipotireoidismo ou eutireoidismo, elevada captação de I^{131} , organificação normal de iodeto, valores de TSH elevados com níveis baixos ou normais de T4 e T3 e níveis baixos ou indetectáveis de TG mesmo após estímulo com TSH humano recombinante (TSHhr) (Medeiros-Neto et al, 2002; Knobel & Medeiros-Neto, 2003).

O HC não tratado precocemente, invariavelmente conduz a marcantes efeitos no desenvolvimento neurológico. A severidade desses efeitos está correlacionada com a época do aparecimento ou detecção da doença, a magnitude da deficiência e o início da terapia de reposição hormonal adequada, bem como a presença de iodo nutricional abundante e adequado (Porterfield & Hendrich, 1993; Lindsay et al, 1997).

Tireoglobulina

Estrutura, expressão e regulação

A TG é uma glicoproteína de 660 KDa sintetizada e secretada pelas células tireoideanas dentro do lúmen folicular. A TG é sintetizada como molécula de 12S,

que forma homodímeros de 19S e até tetrâmeros de 27S. O gene da TG localiza-se no cromossomo 8q24.2- 8q24.3, e é formado por 48 exons separados por introns que variam no tamanho (número de aceso *GenBank NT_008046*) (Parma et al, 1987; Mendive et al, 1999; Moya et al, 2000; Mendive et al, 2001). A expressão do gene da TG é controlada positivamente pelo TSH através da modulação da concentração intracelular do AMPc via seu receptor (rTSH), localizado na membrana basal da célula. A transcrição do gene da TG é regulada por fatores específicos da tireóide: TTF-1, TTF-2 e PAX-8 (Mendive et al, 2001).

O RNAm da TG tem aproximadamente 8,5Kb, e sua sequência é altamente heterogênea devido a existência de 21 polimorfismos (van de Graaf et al, 1997; Mendive et al, 1997; Hishinuma et al, 1999; van de Graaf et al, 2001; Hishinuma et al, 2006), 12 produtos de *splicing* alternativo presentes na célula tireoideana normal (Mercken et al, 1989; Beratux et al, 1991; Targovnik et al, 1992; Mason et al, 1995; Beratux et al, 1995; van de Graaf et al, 1997) e quatro diferentes sítios de poliadenilação (Mercken et al, 1989).

O monômero pré-protéico possui um peptídeo sinal composto por 19 aminoácidos seguido por um peptídeo de 2749 resíduos. Oitenta por cento da estrutura primária do monômero apresentam três diferentes famílias de unidades de repetição ricas em cisteínas (Tipos I, II e III) (Molina et al, 1996a e 1996b; Malthièry et al, 1987; van de Graaf et al, 2001). A análise detalhada destas unidades de repetição mostrou a seguinte distribuição: a) onze repetições Tipo I: I.2, I.4, I.7, I.10 e I.11, cada uma codificada por um único exon (exon 4, 8, 10, 16, e 22 respectivamente), repetições I.1 e I.9 por dois exons (exons 2 e 3, e 14 e 15 respectivamente), repetições I.3 e I.8 por três exons (exon 5, 6 e 7 e 11, 12, e 13

respectivamente) e repetições I.5 e I.6 que correspondem a frações do exon 9; b) três unidades de repetição Tipo II, as quais mapeiam-se entre os exons 20 e 21; c) duas unidades Tipo III: IIIa e IIIb, mapeadas entre os exons 23 e 37. As repetições Tipo I poderiam funcionar como ligantes e inibidores reversíveis da protease lisossomal. Os 20% restantes do monômero constituem o domínio não repetitivo carboxi-terminal, que apresenta homologia com a acetilcolinesterase (AChE) (Swillens et al, 1986; Park et al, 2004) (Figura 2).

Após a tradução, a TG sofre intenso processamento pós traducional no retículo endoplasmático rugoso (RER), no aparelho de Golgi, na membrana apical e no lúmen folicular, que inclui a formação de homodímeros, de pontes dissulfetos, glicosilação, fosforilação, iodinação e multimerização (Desphande & Venkatesh, 1999). Proteínas chaperonas (Erp72, calnexin, Grp94 e Bip), interagem com a TG no RER durante sua maturação para evitar que moléculas imprópriamente estruturadas sejam exportadas para o colóide (Kuznetsov et al, 1994; Kim et al, 1995; Medeiros-Neto et al, 1996; van de Graaf et al, 2001). Este processo é conhecido como controle de qualidade do retículo endoplasmático rugoso (Hammond & Helenius et al, 1995).

Quando a TG chega ao lúmen folicular, diversos resíduos de tirosina são iodinados e alguns destes se acoplam para formar T3 e T4. Na TG humana, quatro sítios receptores de tirosina hormonogênicos foram identificados, localizados nas posições 5 (exon 2), 1291 (exon 18), 2554 (exon 44) e 2747 (exon 48) (van de Graaf et al, 2001), enquanto três sítios doadores de tirosina foram localizados nas posições 130 (exon 4), 847 (exon 10) e 1448 (exon 21) (Lamas et al, 1989). A tirosina na posição 5 é o sítio receptor mais comum de iodotirosina doada da posição 130 (Palumbo et al, 1990; Dunn et al, 1998).

Ainda no lúmen folicular, a TG interage com diversas proteínas da membrana apical do tireócito durante a exocitose e endocitose, como por exemplo: ASGPR (*Apical Membrane Asialoglycoprotein Receptor*) (Ulianich et al, 1999), *Megalin* (Zheng et al, 1998; Marino et al, 1999; Marino et al, 2000; Marino et al, 2001) e PDI (*Protein Dissulfide Isomerase*) (Metzghrani et al, 1997; Metzghrani et al 2000). Acredita-se que ASGPR transporte indiretamente a TG sintetizada para o lúmen folicular e que ainda participe da endocitose e da clivagem proteolítica da TG iodinada, mas a região da proteína que interage com este receptor ainda é desconhecida (Ulianich et al, 1999).

A TG folicular atua como um supressor da função tireoideana inibindo a expressão de TTF-1, TTF-2 e PAX-8 e, conseqüentemente, diminuindo a expressão dos genes TG, TPO, NIS e rTSH. Estes achados suportam a idéia de que a TG exógena não seja somente um substrato para a síntese dos hormônios tireoideanos, mas também um regulador da função tireoideana (Suzuki et al, 1998; Suzuki et al, 1999a; Suzuki et al, 1999b; Suzuki et al, 1999c).

Figura 2: Estrutura da TG humana. a) representação esquemática das três famílias de unidades de repetição (Tipo I, II e III) com suas respectivas divisões e da região homóloga a acetilcolinesterase (Domínio AChE). b) sequência da TG selvagem, mostrando a localização dos domínios repetitivos e do domínio AChE. SP: peptídeo sinal. As setas apontam os sítios receptores de tirosina. (Rivolta et al, 2006).

Mutações no gene da TG em animais

Hipotireoidismo associado a mutações no gene da TG tem sido relatado não somente em humanos como também em animais, como por exemplo, em: gado africano, cabras holandesas, camundongos e ratos (Tabela 1).

O bócio congênito do gado africano é uma moléstia autossômica recessiva caracterizada pelo defeito na síntese de TG. A mutação identificada nestes animais é a troca de citosina (C) por timina (T) na posição 2146 no exon 9 (2146 C>T), que introduz um códon de parada na posição 697 da proteína (R697X) (Tassi et al, 1984; Ricketts et al, 1985a; Ricketts et al, 1985b; Ricketts et al, 1987). Esta mutação é removida do RNAm através da perda do exon 9 por *splicing* alternativo. Mesmo sendo de tamanho menor, o RNAm da TG é traduzido em proteína potencialmente funcional (Ricketts et al, 1987).

Já nas cabras holandesas, o hipotireoidismo com bócio é causado pela substituição da citosina por guanina (G) na posição 945 no exon 8 (945C>G), gerando um códon de parada na posição 296 da proteína (Sterk et al, 1989; van Ommen et al, 1989; Veenboer et al, 1993).

O severo hipotireoidismo com bócio e a deficiência de colóide no camundongo *cog/cog* foram associados à deficiência de síntese de TG (Kim et al, 1998). A mutação presente é a substituição de timina por citosina na posição 6848 (6848T>C), que promove a troca de leucina por prolina na posição 2263 da proteína (L2263P). Esta troca de aminoácido provoca grave defeito no mecanismo de liberação da TG do RER.

No rato *WIC-rdw*, o hipotireoidismo é marcado por hipoplasia da glândula tireóide, com elevados níveis de TSH e baixos níveis de T3 e T4 (Hishinuma et al,

2000; Kim et al, 2000). O sequenciamento do gene revelou a troca de guanina por citosina na posição 6958 (6958 G>C), levando à troca do aminoácido glicina por arginina na posição 2320 da proteína (G2320R). Assim como no modelo de camundongo *cog/cog*, esta mutação promove alteração conformacional da proteína, ficando retida dentro do RER (Hishinuma et al, 2000; Kim et al, 2000; Baryshev et al, 2004).

Tabela 1: Mutações no gene da TG descritas em animais.

Espécie	Fenótipo	Posição nucleotídeo	Posição aminoácido
Gado africano	Bócio/eutireoidismo	2148C>T	R697X
Cabra holandêsa	Bócio/hipotireoidismo	945C>G	Y296X
Camundongo <i>cog/cog</i>	Bócio/hipotireoidismo	6848T>C	L2263P
Rato <i>WIC-rdw</i>	Hipotireoidismo	6958G>C	G2320R

Mutações no gene da TG em humanos

Até o momento 38 mutações inativantes no gene da TG foram identificadas, sendo: 22 mutações *missense* (C175G, Q310P, Q851H, S971I, R989C, P993L, C1058R, C1245R, S1447N, C1588F, C1878Y, I1912V, C1977S, C1987Y, C2135Y, R2223H, G2300D, R2317Q, G2355V, G2356R, A2215D, C164Y); 8 mutações em sítios de *splice* (IVS3–3C>G, IVS5+1G>A, IVS10–1G>A, IVS24+1G>C, IVS30+1G>T, IVS30+1G>A, IVS34–1G>C, IVS45+2T>A); 5 mutações *nonsense* (R277X, Q692X, W1418X, R1511X, Q2638X); duas deleções (G362fsX382, D1494fsX1547) e uma inserção (L234fsX237) (Targovnik et al, 1989; Targovnik et al, 1990; Ieiri et al, 1991; Targovnik et al, 1993; Medeiros-Neto et al, 1993; Targovnik et al, 1995; Medeiros-Neto et al, 1996; Targovnik et al, 1998; van de

Graaf et al, 1999a; van de Graaf et al, 1999b; Hishinuma et al, 1999; Targovnik et al, 2001; Caron et al, 2003; Gutnisky et al, 2004; Rivolta et al, 2005; Mendive et al, 2005; Hishinuma et al, 2005; Vono-Toniolo et al, 2005; Kitanaka et al, 2006; Alzahrani et al, 2006; Hishinuma et al, 2006; Caputo et al, 2007) (Tabela 2 e Figura 3).

Mutações *missense*

A substituição de citosina por timina na posição 3787 do gene, que leva à troca do aminoácido cisteína por arginina na posição 1245 (exon 17) da proteína (C1245R), e a substituição de timina por adenina (A) na posição 5983 (exon 33) do gene, que promove a troca do aminoácido cisteína por serina na posição 1977 (C1977S) foram descritas por Hishinuma et al em 1999. Ambas mutações alteram a estrutura tridimensional da TG, e conseqüentemente, promovem sua retenção dentro do RER.

Outra mutação *missense* já descrita é a troca de guanina por adenina na posição 6725 no gene (exon 38), que leva a substituição de arginina por histidina na posição 2223 da proteína (R2223H). Análises computacionais mostraram que esta mutação promove a abertura da hélice protéica, e conseqüentemente, diminui a estabilidade na exportação da TG (Caron et al, 2003).

Recentes estudos realizados por Hishinuma et al (2005) mostraram a associação de mutações no gene da TG com o desenvolvimento de câncer. Estes autores reportaram que algumas mutações no gene da TG (C1245R, C1977S, C1058R e C1245R/G2356R), identificadas em amostras de carcinoma folicular ou papilífero, aumentaram a incidência do câncer.

Mutações em sítios de *splice*

O primeiro caso de mutação associada à expressão anormal de TG foi descrita por Ieiri et al (1991). Estudos moleculares mostraram a perda do exon quatro no RNAm da TG, o que levou à síntese de uma proteína menor, sem um segmento peptídico de 68 aminoácidos. Esta perda ocorre devido a substituição da citosina por guanina na posição -3 no sítio receptor de *splice* no intron três (IVS3-3C>G). A tirosina localizada na posição 130 (exon 4) tem sido proposta como um importante sítio doador de tirosina na síntese de tiroxina (Lamas et al, 1989; Palumbo et al, 1990; Dunn et al, 1998).

Nosso grupo identificou em uma família brasileira a troca de guanina por timina na posição +1 do sítio doador de *splice* no intron 30 (IVS30+1G>T) que promove a perda de 138 nucleotídeos (exon 30 inteiro), e a síntese de uma proteína de menor tamanho (menos 46 aminoácidos) (Targovnik et al, 1995; Targovnik et al, 2001).

Outra mutação de intron já identificada é a troca de guanina por citosina na posição -1 do sítio receptor de *splice* no intron 34, a qual promove a perda do exon 35 e a síntese de um RNAm de menor tamanho (Gutnisky et al 2004).

Mutações *nonsense*

A mutação *nonsense* mais freqüente no gene da TG é a R277X. Esta alteração é causada pela substituição de citosina por timina na posição 886 do gene (exon 7), a qual promove a troca de arginina por códon de parada na posição 277 da proteína (van de Graaf et al, 1999b; Gutnisky et al, 2004; Rivolta et al, 2005). Análises do RNAm da TG excluíram a presença de *splicing* alternativo, que eliminaria o códon

de parada dando continuidade à leitura do gene (Targovnik et al, 1993; van de Graaf et al, 1999b; Rivolta et al, 2005).

Outra mutação *nonsense* é a troca de citosina por timina na posição 4588 do gene (exon 22), que causa a substituição de arginina por códon de parada na posição 1510 da proteína (R1510X) (Baas et al, 1985; Targovnik et al, 1998; Gutnisky et al, 2004; Mendive et al, 2005). Contudo, esta mutação é removida do RNAm por *splicing* alternativo, dando continuidade à leitura e à tradução do gene. Este mecanismo ocorre também na célula tireoideana normal (sem mutação), mas com menor frequência (Targovnik et al, 1992). A consequência funcional da deleção do exon 22 poderia estar relacionada com a alteração na estrutura da proteína, que diminuiria a capacidade do RER de exportar TG (Rivolta et al, 2006).

Deleções e inserções

A primeira deleção no gene da TG foi descrita por Caron et al (2003). A deleção da citosina na posição 1143 no exon 9 (1143delC) introduz um códon de parada na posição 382 da proteína (G362fsX382), sintetizando uma proteína truncada.

A outra deleção já identificada é a da guanina na posição 4537 (exon 22) que introduz um códon de parada na posição 1547 da proteína (D149fsX1547) e também leva à síntese de uma proteína de tamanho menor (Hishinuma et al, 2005).

Caputo et al (2007) descreveram pela primeira vez a presença da inserção de um nucleotídeo no gene da TG associada ao HC. A duplicação de uma adenina entre as posições 759-760 (exon 7) introduz um códon de parada prematuro na posição 237 da proteína (L234fsX237).

Tabela 2: Mutações identificadas no gene da TG humana (Rivolta et al 2006).

Exon/Intron	Posição no DNA	Posição na proteína e consequência
Intron 3	IVS3-3C>G	Perda do exon 4
Exon 5	548G>A	C164Y
Exon 5	580T>G	C175G
Intron 5	IVS5+1G>A	Perda do exon 5
Exon 7	759-760insA	L234fsX237
Exon 7	886C>T	R277X
Exon 8	986A>C	Q310P
Exon 9	1143delC	G362fsX382
Exon 9	2131C>T	Q692X
Exon 10	2610G>T	Q851H
Intron 10	IVS10-1G>A	Perda do exon 11
Exon 11	2969G>A	S971I
Exon 12	3022C>T	R989C
Exon 12	3035C>T	P993L
Exon 14	3229T>C	C1058R
Exon 17	3790T>C	C1245R
Exon 20	4310G>A	W1418X
Exon 21	4397G>A	S1447N
Exon 22	4537delG	D1494fsX1547
Exon 22	4588C>T	R1511X, Perda do exon 22
Exon 24	4820G>T	C1588F
Intron 24	IVS24+1G>C	Perda do exon 24
Intron 30	IVS30+1G>T	Perda do exon 30
Intron 30	IVS30+1G>A	Perda do exon 30
Exon 31	5690G>A	C1878Y
Exon 31	5791A>G	I1912V
Exon 33	5986T>A	C1977S
Exon 33	6017G>A	C1987Y
Intron 34	IVS34-1G>C	Perda do exon 35
Exon 37	6461G>A	C2135Y
Exon 38	6701C>A	A2215D
Exon 38	6725G>A	R2223H
Exon 40	6956G>A	G2300D
Exon 40	7007G>A	R2317Q
Exon 41	7121G>T	G2355V
Exon 41	7123G>A	G2356R
Intron 45	IVS45+2T>A	Perda do exon 45
Exon 46	7969C>T	Q2638X

C: cisteína; **G:** glicina; **R:** arginina; **X:** códon de parada; **Q:** glutamina; **P:** prolina; **H:** histidina; **S:** serina; **L:** leucina; **W:** triptofano; **N:** asparagina; **F:** fenilalanina; **Y:** tirosina; **V:** valina; **D:** ácido aspártico; **I:** isoleucina; **A:** alanina.

Polimorfismos do gene da TG em humanos

O termo polimorfismo se refere a: a) variações na composição da base do nucleotídeo (SNP-*single nucleotide polymorphism*), b) sequência de inserções ou deleções (indel), c) grandes repetições de nucleotídeos (VNTR-*variable number of tandem repeats* ou minisatélites) e d) pequenas repetições de nucleotídios (STR-*short tandem repeats* ou microsatélites) presentes no genoma de uma população. Estes polimorfismos são marcadores genéticos importantes para o estudo de ligação em famílias com HC ou para a investigação de um ancestral comum dos indivíduos afetados por uma mesma mutação (Rivolta et al, 2006).

Até o momento 21 SNPs foram identificados no gene da TG, sendo que 14 promovem a troca de aminoácidos: G58S, S715A, S715L, G796R, Q811E, R969P, M1009V, G1293D, T1479M, N1819D, R1980W, P2213L, W2482R, R2511Q (van de Graaf et al 1997; Mendive et al, 1997; Hishinuma et al, 1999; van de Graaf et al, 2001; Hishinuma et al, 2006) (Tabela 3, Figura 3). Um indel de 1464pb localizado no intron 18 foi identificado no gene da TG por Moya et al (2003). Evidências genéticas indicam que pequenas adições ou deleções podem ocorrer espontaneamente no gene durante a replicação, ou durante a recombinação gênica (Rivolta et al, 2006).

Quatro STRs foram identificados e caracterizados nos introns: 10 (TGms1), 27 (TGms2), 29 (TGrI29) e 30 (TGrI30) do gene da TG (Tomer et al, 2002; Rivolta et al, 2002).

Tabela 3: Polimorfismos identificados no gene da TG humana.

Exon	Posição no Nucleotídeo	Posição do Aminoácido
3	229G>A	G58S
4	426C>T	D123D
10	2200T>G	S715A
10	2330C>T	P758L
10	2334T>C	P759P
10	2443G>A	G796R
10	2488C>G	Q811E
11	2963G>C	R969P
12	3082A>G	M1009V
16	3474T>C	S1139S
18	3906G>A	P1283P
18	3935G>A	G1293D
21	4493C>T	T1479M
21	4506C>T	A1483A
29	5512A>G	N1819D
33	5995C>T	R1980W
38	6695C>T	P2213L
43	7408C>T	L2451L
43	7501T>C	W2482R
44	7589A>G	Q2511R
46	7920C>T	Y2621Y

Figura 3: Mutações e polimorfismos do gene da TG humana (Rivolta et al, 2006; Caputo et al, 2007).

Tendo em vista que mutações no gene da TG são a segunda causa genética conhecida do HC por defeito de síntese hormonal, e que embora diversas mutações e polimorfismos já foram descritos na literatura, poucos são os trabalhos que realizaram estudos funcionais destas mutações. Sendo assim, encontrou-se importante justificativa para o presente trabalho, que visou identificar mutações no gene da TG em um importante número de pacientes brasileiros (n=13) com HC e suspeita clínica de possível defeito de TG, além de realizar estudo funcional de alguma das mutações identificadas neste estudo.

II. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

1- Caracterizar alterações na sequência do gene da tireoglobulina em 13 pacientes brasileiros com hipotireoidismo congênito, por disormonogênese causado por provável defeito de síntese de tireoglobulina.

2-Verificar o efeito funcional da mutação A2215D, identificada neste estudo, através de estudos *in vitro*.

III. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Pacientes

Foram incluídos neste estudo 13 pacientes de nove famílias brasileiras com hipotireoidismo congênito por provável defeito na síntese de TG, sendo oito oriundos de Minas Gerais, quatro de Sergipe e um de Pernambuco.

Sete pacientes tiveram o diagnóstico de hipotireoidismo congênito confirmado logo após o nascimento, no teste do pezinho (Tabela 4). Aos três anos de idade, os pacientes foram submetidos a testes laboratoriais e exames radiológicos na ausência da L-tiroxina para esclarecimento do diagnóstico etiológico do hipotireoidismo congênito (Tabela 5). O uso da L-tiroxina foi suspenso duas semanas antes da realização dos testes.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e o termo de consentimento esclarecido foi assinado pelos pacientes ou pelos pais dos pacientes menores de 18 anos.

1) Família 1

- **Paciente ACLBS**

Natural de Belo Horizonte, Minas Gerais. O HC foi detectado na triagem neonatal e confirmado aos três anos de idade (Tabelas 4 e 5). Pais negam consangüinidade. Possui uma irmã não afetada e somente a irmã da avó materna apresentou hipotireoidismo.

2) Família 2

- **Paciente MCS**

Natural de Divinópolis, Minas Gerais. O HC foi detectado na triagem neonatal e confirmado aos três anos de idade (Tabelas 4 e 5). Pais negam consangüinidade. Possui uma irmã não afetada e não há relatos de outros casos de hipotireoidismo na família.

3) Família 3

- **Paciente SOP**

Natural de Brumadinho, Minas Gerais. O HC foi detectado na triagem neonatal e confirmado aos três anos de idade (Tabelas 4 e 5). Pais negam consangüinidade. Possui uma irmã não afetada e somente a avó paterna apresentou hipotireoidismo.

4) Família 4:

- **Pacientes HS e JMS**

Naturais de Piranguinhos, Minas Gerais. O paciente JMS teve o diagnóstico de HC detectado na triagem neonatal e confirmado aos três anos de idade (Tabelas 4 e

5). Já a paciente HS teve o diagnóstico tardio, aos seis anos de idade (Tabela 5). Recebeu tratamento adequado, mas persistiu com discreto retardo mental. Possuem uma irmã não afetada. Pais negam consanguinidade. Relatos indicam que a avó materna apresentou hipotireoidismo.

5) Família 5

- **Paciente SCS**

Natural de João Pinheiro, Minas Gerais. O HC foi detectado na triagem neonatal e confirmado aos três anos de idade (Tabelas 4 e 5). Pais negam consanguinidade. Não possui irmãos. A mãe, a avó materna e a bisavó paterna apresentaram hipotireoidismo.

6) Família 6

- **Paciente LPS**

Natural de Montezuma, Minas Gerais. O HC foi detectado na triagem neonatal e confirmado aos três anos de idade (Tabelas 4 e 5). Pais negam consanguinidade. Não possui irmãos, e na família não há descrição de outros casos de hipotireoidismo.

7) Família 7

- **Paciente WRJ**

Natural de Belo Horizonte, Minas Gerais. O HC foi detectado na triagem neonatal e confirmado aos três anos de idade (Tabelas 4 e 5). Pais negam consanguinidade. Não há descrição de casos de hipotireoidismo na família.

8) Família 8

- **Pacientes AM, EM, ASJ e AS**

Naturais de Aracaju, Sergipe. Os irmãos EM e AM possuem pais consangüíneos. Já os pais dos irmãos ASJ e AS, primos de AM e EM, não são consangüíneos. Nesta família ocorreu cinco casos adicionais de hipotireoidismo na fase adulta (Figura 4).

O paciente AM teve diagnóstico tardio de bócio com HC, aos seis anos de idade, quando sua mãe estava grávida de sua segunda filha (EM) (Tabela 5). A idade óssea foi de dois anos e oito meses para uma idade cronológica de seis anos. Com o uso adequado da L-tiroxina evoluiu para o eutireoidismo, mas com baixa concentração de TG sérica e seqüela neurológica permanente. Sua irmã, EM, apresentou bócio durante o período intra-uterino. Este caso clínico foi relatado por nosso grupo em trabalho anterior (Medeiros-Neto et al, 1997). A mãe, aos 27 anos de idade, chegou ao Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo com 23 semanas de gestação. Como seu primeiro filho (AM) apresentou bócio e hipotireoidismo congênito, foram realizados testes laboratoriais e radiológicos na paciente. Os testes hormonais maternos realizados com 26 semanas de gestação revelaram níveis normais de T3 e T4 total, com T4 livre no limite inferior de normalidade. Os valores de TSH e TG estavam dentro do limite da normalidade. O ultra-som da tireóide materna revelou glândula normal (peso 10,7g), e o do feto, mostrou volumoso bócio fetal (aproximadamente 12,3g). A cordocentese foi realizada com 29 semanas de gestação, confirmando o hipotireoidismo fetal: TSH 61,3µUI/mL (normal < 10,9µU/mL), T4 livre 0,2ng/dL (normal 0,5-1,1ng/dL), T3 e T4 total com valores muito baixos. Surpreendentemente, o valor da TG sérica foi de 1,3ng/mL (normal 5-30ng/mL), muito baixo para um volumoso bócio, sugerindo que a disormonogênese poderia ser

causada por defeito na síntese de TG. Com 30 semanas de gestação foi realizado tratamento intra-uterino através da injeção de 400µg L-tiroxina. Após quatro semanas da injeção, a ultra-sonografia confirmou a redução do tamanho da glândula (de 12,5mL para 4,8mL). A paciente nasceu com 37 semanas de gestação com 3,190g. Testes realizados no sangue do cordão umbilical revelaram valores normais para T4 total, T4 livre e TSH, e valores indetectáveis para TG (Tabela 5). A paciente recebeu doses adequadas de L-tiroxina e desenvolveu-se normalmente, sem nenhuma seqüela neurológica.

O paciente ASJ teve o diagnóstico do HC tardio, aos 11,7 anos de idade. Chegou ao hospital com história de crises convulsivas e apresentava idade estatural de sete anos e idade óssea de nove anos de idade. Testes laboratoriais confirmaram a presença de bócio e hipotireoidismo congênito (Tabela 5). Recebeu doses adequadas de L-tiroxina, mas apresentou discreto grau de retardo mental, com prejuízo no rendimento escolar apesar da facilidade em jogos eletrônicos. Sua irmã, AS, chegou ao hospital com dois meses de idade apresentando história de choro rouco, sonolência, cabelos esparsos, seborréia, macroglossia, bócio e pequena hérnia umbilical. Sua estatura era de 56cm e seu peso de 4980g. O hipotireoidismo congênito foi confirmado através de exames laboratoriais (Tabela 5). Recebeu doses adequadas de L-tiroxina e apresentou maturação óssea, puberdade e desenvolvimento neuropsicomotor normal.

Figura 4: Heredograma da família 8.

9) Família 9

• Paciente ACFM

Paciente natural de Pernambuco. Os pais são consangüíneos. Possui cinco irmãos, sendo quatro afetados com presumível HC e bócio. Os quatro filhos são normais. A paciente chegou ao Hospital das Clínicas em 2002, com a principal queixa de bócio volumoso. A paciente referiu que desde os oito anos de idade começou a apresentar aumento visível do volume da região cervical anterior, sem outras queixas. Negava dor local, constipação, alterações de pele ou dos fâneros. Naquela época procurou assistência médica e após realização de exames laboratoriais, recebeu o diagnóstico de “tireoidopatia”, mas não foi prescrita qualquer medicação. Evoluiu com aumento lento e progressivo do volume da tireóide até que há cerca de sete anos, durante sua segunda gestação, começou a apresentar astenia, constipação, queda de cabelos, pele seca e disfagia para alimentos sólidos. Após a

realização de exames complementares em 2002, iniciou o uso de L-tiroxina, inicialmente na dose de 100µg e posteriormente na dose de 150µg. Porém, desde o início da última gestação (2005) a L-tiroxina foi suspensa por conta própria. No Hospital das Clínicas a ultra-sonografia indicou presença de múltiplos nódulos mistos, o maior medindo 4,1x4,2x2,8cm. A paciente foi submetida a tireoidectomia total em junho de 2006, onde exames laboratoriais confirmaram o HC (Tabela 5). O diagnóstico anátomo-patológico foi de bócio adenomatoso e hiperplasia folicular com áreas de células de Hurthle.

Tabela 4: Dosagens hormonais realizadas no teste do pezinho.

Pacientes	TSH (µUI/L)	T4 total (nmol/L)
MCS	155,3	38,79
SOP	154,5	24,6
JMS	200	12
WRJ	93,7	48,3
Ref.	15	80

Tabela 5: Testes realizados para confirmação do hipotireoidismo congênito.

Pacientes	TSH (μ UI/mL)	T4 total (mg/dL)	T4 livre (ng/mL)	TG (ng/mL)	Perclorato (%)	Volume (mL)	Captação de iodo (%)	
							6 hs	24hs
ACLBS	348,6	-	0,33	7,1	negativo	9,30	36,1	39,6
MCS	467,1	1,1	0,23	1,8	negativo	7,4	52,6	66,4
SOP	221,3	2,9	0,41	0,1	negativo	9,60	17,4	13,8
HS	237,9	2,0	0,35	0,1	duvidoso	18,83	45,1	46,9
JMS	571,8	1,0	0,19	0,1	negativo	7,53	48,8	57,7
SCS	759,1	1,0	0,19	0,1	negativo	5,5	14,4	25,4
LPS	521,0	-	0,15	4,7	negativo	6,54	29,5	25,7
WRJ	385,0	-	-	0,1	negativo	7,84	32	30,7
AM*	0,90	12,0	1,90	<0,5	-	8,16	-	-
EM**	41,6	10,5	0,90	<0,5	-	1,8	-	-
ASJ*	0,83	9,4	-	0,6	-	12,4	-	-
AS***	23,0	4,8	-	-	-	10,2	-	-
ACFM****	4,15	4,8	0,63	4,2	-	88,0	61	82
Ref. RN ⁺	<45	8-10	0,5-1,1	-		0,36		
Ref. Crianças	0,5-4,5	4-12	0,7-1,7	1,5-15	<10	1,6-6,0 ⁺⁺	4-18	18-36
Ref. Adultos	0,5-4,5	4-12	0,7-1,7	1,5-15	<10	6-14	4-18	18-36

*Em uso de L-tiroxina; **Valores dosados no sangue de cordão umbilical; ***valores aos dois meses de idade; ****valores pré-cirúrgicos; ⁺RN: recém-nascido. ⁺⁺ Volume variável de acordo com a estatura.

Indivíduos Controles

Foram estudados amostra de DNAs de 100 indivíduos brasileiros sem doença tireoideana (controles) para a confirmação da presença das novas mutações IVS46-1G>A e Q2142X na população brasileira.

Dosagens hormonais

As dosagens de TSH, T4 total, T4 livre e TG séricas foram realizadas empregando-se os estojos comerciais *Elecsys* eletroquimioluminescência (Roche Corporation Indianópolis, IN, EUA).

Teste de estímulo com TSH humano recombinante (TSHhr)

Para confirmar a deficiência na síntese de TG os pacientes foram submetidos ao teste de estímulo com TSHhr. Foram coletadas amostras de sangue antes e após 24 e 48 horas da aplicação de 0,45mg de TSHhr intramuscular (Thyrogen, Genzyme Corporation USA) para dosagem de TG sérica.

Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico dos pacientes portadores de defeito na síntese de TG e de familiares através do método de SDS-proteínase K (Miller et al, 1988; modificado).

Para cada 10mL de sangue foram adicionados 30mL de tampão de lise (1mM de NH_4HCO_3 , 114mM NH_4Cl). Homogeneizou-se por inversão e incubou-se a 4°C por 30 minutos. Centrifugou-se a 3000RPM a 4°C por 15 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e repetiu-se este processo de lavagem por três vezes. Posteriormente, foram adicionados 6mL de tampão TEN (0,5mL de TRIS 2M pH 8; 2,0mL EDTA 0,5M; 5,0mL NaCl 3M), 120 μL de SDS 10% e 80 μL de proteinase K (100/mL) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Homogeneizou-se bem e incubou-se a 37°C por 18 horas. Acrescentou-se 2,4mL de NaCl 5M, agitou-se vigorosamente por 15 segundos e centrifugou-se a 3000RPM a 20°C por 15 minutos. Transferiu-se o sobrenadante contendo o DNA desproteinizado para um tubo limpo e 2 volumes de etanol absoluto foram adicionados. Inverteu-se o tubo por diversas vezes até a visualização do DNA precipitado. O DNA foi removido para outro tubo e lavado com etanol 70%. Após a secagem, o material foi ressuspenso em 1mL de água.

Amplificação pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Os 48 exons e as junções exon/intron existentes no gene da TG foram amplificados por PCR. O volume final das reações foi de 25µL. Utilizou-se 1X PCR buffer (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 100-300ng de DNA genômico, 2,5mM MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), 0,1U de *Taq* polimerase e 10µM de cada iniciador (Gutnisky et al, 2004) (Tabela 6).

As amostras foram denaturadas a 95°C por 3 minutos, seguidas de 40 ciclos de amplificação de: 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Depois do último ciclo, as amostras foram incubadas a 72°C por 10 minutos.

Os produtos da amplificação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio (0,001mg/mL).

Tabela 6: Iniciadores utilizados nas reações de PCR e sequenciamento (Gutnisky et al, 2004)

Exon	Iniciadores <i>sense</i>		Tamanho (pb)	Iniciadores <i>anti-sense</i>	
	Posição	Seqüência de Nucleotídeo (5'→3')		Posição	Seqüência de Nucleotídeo (5'→3')
1	-208	<i>cgttctgttccccacagtt</i>	338	+22	<i>gctccatggcctcagaactt</i>
2	-38	<i>ccacactcttctctgatgaa</i>	242	+95	<i>agttgcaggggcagagctcaggaa</i>
3	-138	<i>ccactccactctctccctaa</i>	327	+91	<i>gctcagtcacccacccaaa</i>
4	-84	<i>gggaagggagcatgagttt</i>	355	+67	<i>ggatcgagtgaggaaa</i>
5	-83	<i>gggacacgagtgcatatg</i>	299	+56	<i>agtgtgggctgcgtcagggtgat</i>
6	-54	<i>gctgtgatgacttgcctt</i>	260	+99	<i>cagtcactctagctgtgctt</i>
7	-42	<i>ctgaatgagaccatctctgaa</i>	216	+30	<i>cacgcacattgttggcagtt</i>
8	-63	<i>gcatgctgtgaagacaccaa</i>	277	+28	<i>aaagaggaagccccagaggaaa</i>
9 A	-96	<i>gttctggcttcttactact</i>	570	1549	<i>CTTCTTGTCTCCCTCCAT*</i>
B	1389	<i>CCCAAAGAGACTCCAGCAA*</i>	477	1865	<i>GTCGTGCATGATGGGACAAA*</i>
C	1758	<i>TGTGCCAGAAGATGTGGCAA*</i>	473	+54	<i>agggcctaaagagagactca</i>
10 A	-92	<i>gacggagtttggacagtt</i>	363	2447	<i>TTTCCGGAAGCTGCTTCT*</i>
B	2397	<i>TGCCAAGCTGCTAGTGAA*</i>	460	+95	<i>ccctcccactagacatcctt</i>
11	-83	<i>cgtgagggcacacatgctt</i>	404	+81	<i>aggatgactgaggagagac</i>
12	-61	<i>agctacagagcccacacaga</i>	237	+38	<i>tgctacttggccacctgaa</i>
13	-46	<i>gtccctagtgaattcctgaa</i>	182	+58	<i>tagaccagtgatgccaccaa</i>
14	-39	<i>ccacgaccagtctttacaa</i>	208	+56	<i>atctctgaccagcggggacaa</i>
15	-73	<i>catctgccagcagcaggtt</i>	259	+83	<i>gacacgaagccagctcttt</i>
16	-38	<i>actgattccccagccatct</i>	323	+84	<i>cccagcttctctagtact</i>
17	-85	<i>gagaaggagacaccacaa</i>	326	+28	<i>gcaggatagatgctctgat</i>
18	-75	<i>gcagaggaaatcccaa</i>	278	+48	<i>ccctgagttcagtccaa</i>
19	-120	<i>gtagggttggtggaggatt</i>	327	+50	<i>ctcagagaggctgcatagctt</i>
20	-51	<i>ccctagcagagtacagt</i>	313	+43	<i>cacatggctccacaggagat</i>
21	-70	<i>gtgtgttctgggattgt</i>	264	+44	<i>cattgcagggcttttct</i>
22	-48	<i>gattccagaggccatt</i>	280	+61	<i>agcccttgagactact</i>
23	-61	<i>cttctctgcagatgccta</i>	220	+42	<i>ccacaccttcttctgagt</i>
24	-39	<i>gggaaagccaggtgagtga</i>	199	+44	<i>acagcggatgaggagcagaa</i>
25	-79	<i>ggttaggggttgatgaatg</i>	361	+173	<i>agcgtgctgtgctgagtct</i>
26	-61	<i>gctctgtccaactctgcat</i>	326	+73	<i>gtgtgtctgtgcttctgcat</i>
27	-73	<i>tcaggggacagagaagagt</i>	325	+84	<i>ggaggggtcataaagaaagt</i>
28	-80	<i>gagatggggtattgcagta</i>	193	+47	<i>catgtaatcagcgtctgcta</i>
29	-60	<i>gaccagtggagtactacccat</i>	202	+61	<i>gcacccatttagtctctgcat</i>
30	-210	<i>gaactattctgtctgaccc</i>	474	+126	<i>ccacagtgtatcatgattatgacac</i>
31	-77	<i>cccagagaatcctgttagaga</i>	313	+59	<i>accacagagccagcagaaca</i>
32	-52	<i>catgactacagcaaattctc</i>	262	+98	<i>gtgctgggtatgcttctgtt</i>
33	-93	<i>cccgaagcaagaatgacta</i>	274	+101	<i>ggataggagatgctgaggat</i>
34	-104	<i>gtctgtgaacaatgtact</i>	283	+35	<i>gacgtccatatagtctgcat</i>
35	-148	<i>cccacctgaccaataca</i>	321	+110	<i>gcgagtgtatgcaagcta</i>
36	-65	<i>cacggctgtcttcttact</i>	323	+123	<i>cccttactccaagcactcta</i>
37	-79	<i>ggatggatgactggaaga</i>	278	+34	<i>caggatggctgcaaaggcata</i>
38	-74	<i>cagaatgccagtggagagagc</i>	378	+84	<i>ctgctactgagtcacatttgg</i>
39	-95	<i>gctttggaatgggtagtgg</i>	318	+129	<i>ggcaaatcacctaacctcagct</i>
40	-82	<i>tgtgtcaaccaagaatcaggc</i>	368	+126	<i>aaatttccactgtgtgcttag</i>
41	-122	<i>tgaggacaagagccagagc</i>	423	+98	<i>ccaagcaattgaagccaactag</i>
42	-93	<i>gatgcagaacctgatgtgg</i>	381	+123	<i>cagttggctatcagcctcatg</i>
43	-95	<i>accagtattggcattcagtatgg</i>	319	+56	<i>ccagagcccttaggaaatgc</i>
44	-123	<i>ttgtgttaatgccatgcc</i>	375	+70	<i>cctgaacaccaactgagcttgc</i>
45	-145	<i>gggaatgggaagaaggtgttc</i>	344	+91	<i>tagaggggttaagtgtgtgtcc</i>
46	-109	<i>gaagggaaagtcttggtttgg</i>	340	+96	<i>gagttctatgatcaaatggg</i>
47	-97	<i>tgccctcagataccgagtgc</i>	443	+155	<i>ccccagaccatgaacaactca</i>
48	-60	<i>gaccagagaagagaagtccta</i>	380	+81	<i>Acagcagcctgggattcaaa</i>

Letras maiúsculas: iniciadores homólogos à seqüência de exon; **letras minúsculas em negrito:** iniciadores homólogos à seqüência de intron; **minúscula e itálica:** região de promotor. *Os exons nove e dez foram divididos em vários fragmentos de amplificação devido ao excessivo tamanho. Nestes casos, foram empregados iniciadores homólogos a regiões de exons.

Sequenciamento

Foram utilizados dois equipamentos para o sequenciamento dos exons e das junções exon/intron do gene da TG:

1) ABI 377 (Applied Biosystems Corporate, CA, EUA), com uso do estojo comercial *DNA Sequencing Big Dye Terminator v 3. O Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems Corporate, CA, EUA). Para esta reação foram utilizados 200ng de DNA, 1μL de *Big Dye Terminator v 3*, 2μL de tampão de reação e 1μL de iniciador com concentração de 1,6pM para um volume final de 10μL.

2) MegaBace (Amersham Biosciences, NJ, EUA), com uso do estojo comercial *DYEnamic ET dye terminator* (Amersham Biosciences, NJ, EUA). Nesta reação foram empregados 200ng de DNA, 4μL de *DYEnamic ET dye terminator* e 1μL de iniciadores com concentração de 5pM para um volume final de 10μL.

Foram empregados os mesmos iniciadores utilizados para amplificação por PCR (Tabela 6). Os resultados foram analisados através da comparação da sequência obtida com a disponível em banco de dados da internet (número de acesso *GenBank NT_008046*).

Deteção de polimorfismos e microsatélites

Os SNPs foram identificados por sequenciamento. A inserção/deleção de 1464pb no intron 18 foi analisada através do tamanho dos fragmentos amplificados por PCR, utilizando-se iniciadores específicos para esta região e enzima *elongsase* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), a qual permite a amplificação de fragmentos extensos (Moya et al, 2003).

Para a análise dos microsátélites TGrI 29 e TGrI 30, empregou-se a técnica de PCR com uso de iniciadores específicos marcados com material radioativo e exposição por 24 horas para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados, conforme Rivolta et al 2002.

Coleta de amostras de tecido tireoideano

Foram coletadas amostras de tecido tireoideano da paciente ACFM em: a) formol tamponado para posterior realização da técnica de imunohistoquímica e microscopia por coloração de hematoxilina/eosina, b) solução fixadora para microscopia eletrônica e c) nitrogênio líquido para posterior extração de RNA total.

Extração de RNA total

Pulverizou-se 50 a 100mg de tecido congelado em nitrogênio líquido por 1 a 2 minutos no equipamento *Mikro dismembrator U* (B. Braun Biotech Internacional, Allentown, EUA). Em seguida, acrescentou-se 1mL de Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e homogeneizou-se por 10 segundos. O material foi transferido para tubo de 1,5mL e incubado por 5 minutos a 25°C. Adicionou-se 200µL de clorofórmio, agitou-se por 15 segundos e incubou-se por 15 minutos a 25°C. Centrifugou-se a 12000RPM por 15 minutos a 4°C, e a fase aquosa em suspensão foi transferida para outro tubo de 1,5mL onde 500µL de álcool isopropílico foram adicionados. O material foi incubado a -20°C por 30 minutos, e posteriormente, centrifugado a 12000RPM por 20 minutos a 4°C. A fase líquida foi desprezada e 500µL de etanol 70% foram adicionados. Após nova centrifugação a

12000RPM por 10 minutos a 4°C, o sedimento foi seco e ressuspensão em 20µL de água. O RNA foi conservado a -70°C até sua utilização.

Quantificação do RNA total e do DNA

A quantidade e a pureza do RNA e DNA extraídos foram avaliadas pela absorvância das amostras em espectrofotômetro (Pharmacia, Uppsala, Suécia) a 260nm e 280nm, considerando-se que amostras de RNA e DNA de boa qualidade possuem relação $DO_{260}/DO_{280} \geq 1,8$ e $DO_{260}/DO_{280} \geq 1,6$, respectivamente.

Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada empregando-se 2µL de *random hexâmeros* (50mM), 1µL de dNTP (10mM), 1µg de RNA e água q.s.p. 13,5µL. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos. Em seguida, acrescentou-se 4µL de tampão de reação 5x *First strand*, 1µL de DTT (0,1M), 1µL de inibidor de RNase (20U/µL) e 0,5µL da enzima *Super script III RNA H* transcriptase reversa. Esta última reação foi incubada a 50°C por 60 minutos e, em seguida, a 70°C por 15 minutos. Todos os reagentes utilizados eram marca Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA.

Quantificação da expressão gênica por RT-PCR quantitativo em tempo real

A quantificação do RNAm da TG no tecido tireoideano da paciente ACFM foi realizada por RT-PCR (PCR transcriptase reversa) quantitativo em tempo real, empregando-se o aparelho *Rotor-Gene 3000* (Corbett Research, Mortlake, Austrália) e o estojo comercial *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Para esta análise, foram realizadas duas

extrações de RNA total de amostras diferentes de tecido tireoideano da paciente ACFM. Como controle positivo, foram utilizadas amostras de RNAm extraídos de tecido tireoideano de 10 indivíduos controles (sem doença tireoideana). Quantificou-se também a expressão dos genes: TPO, NIS, TTF-1, PAX-8, rTSH e GAPDH (glyceraldeído-3-fosfato desidrogenase), este último foi utilizado como controle interno. As amostras foram aquecidas a 50°C e a 95°C por 2 minutos, seguidos de 45 ciclos de amplificação: 95°C por 20 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Os iniciadores empregados estão descritos na tabela 7. Para o cálculo da expressão gênica foi empregado o método de $\Delta\Delta CT$ (Applied Biosystems, *User Bulletin # 2, ABI Pism 7700 Sequence Detection System*, 1997).

Tabela 7: Iniciadores empregados na PCR em tempo real.

Gene	Iniciador <i>sense</i>	Iniciador <i>anti-sense</i>
GAPDH	5'GCTGGCATTGCCCTCA3'	5'GGCAGGGACTCCCCAG3'
TG	5'GAGCCCTACCTCTTCTGGCA3'	5'GAGGTCCTCATTCTCAGCC3'
TPO	5'CAGAGGCGTGAGCTGGAG 3'	5'AGGCTGGAAATCCCATCC3'
NIS	5'ACACTGACTGCGACCCTCTCCT3'	5'TGCTGAGGGTGCCACTGTAA3'
rTSH	5'CTTGCTGGACGTGTCTCAAA 3'	5'TAAGAAAGGTCAGCCCGTGT3'
PAX-8	5'GGCAGCGACAAGAGGAAAATGG3'	5'GTGGCGTGTGGAAGGGGTCAG3'
TTF-1	5'CAGGACACCATGAGGAACAG 3'	5'GCCATGTTCTTGCTCACGTC3'

Plasmídeos contendo o cDNA da TG

Foram utilizados dois plasmídeos contendo o cDNA da TG, gentilmente doados pelo Dr. Peter Kopp, Professor Associado da Divisão de Endocrinologia, Metabolismo e Medicina Molecular, Northwestern University, Chicago, Illinois.

Estes plasmídeos foram: 1) pTGWT, com o cDNA da TG selvagem (Figura 5) e 2) pTGA2215D, com a mutação (6701C>A) identificada na paciente ACFM.

Figura 5: Plasmídeo pTGWT contendo o cDNA da TG selvagem.

Cultura celular

As células HEK293 (célula renal de embrião humano) e TSA201 (HEK293 modificada), doadas pelo Dr Peter Kopp, foram utilizadas como hospedeiras dos plasmídeos pTGWT e pTGA2215D no estudo funcional da TG. Estas células foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM-4,500mg/L D-glicose, L-glutamina, hidrocloreto de piridoxina, sem piruvato de sódio) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% soro bovino fetal (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e 1,0% de penicilina/estreptomicina (10000 U/mL de penicilina e 10000 µg/mL de

estreptomicina) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), e incubadas a 37°C com 5,0% de CO₂.

As células foram replicadas a cada 48 horas, com prévia lavagem com 1mL D-PBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, sem cálcio e magnésio) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e tratamento com 2mL de Tripsina-EDTA (0,5% Tripsina, 5,3mM EDTA•4Na) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

Transfecção de célula de mamífero

As células TSA201 e HEK293 foram transfectadas através do método de cloreto de cálcio. Foram misturados 300µL de HBS 1X [HBS 2X: 5g de HEPES 1M (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 8g de NaCl; 1g de dextrose; 0,37g de KCl; 0,099g de Na₂HPO₄•7H₂O, água q.s.p 500mL e pH 7,2] e 1000ng de cada plasmídeo (pTGWT e pTGA2215D). Estas soluções foram agitadas a 25°C por 30 segundos. Logo após, foram adicionados vagarosamente 19,8µL de CaCl₂ 2,5M em cada tubo durante agitação. Incubou-se por 10 minutos a 25°C e todo o volume foi transferido para as placas contendo as células.

Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C com 5,0% de CO₂, o primeiro sobrenadante foi coletado. Posteriormente, foram adicionados mais 2mL de meio de cultura e as células foram novamente incubadas por mais 24 horas, quando o segundo sobrenadante foi coletado. Logo em seguida, as células foram lisadas para obtenção do extrato protéico.

Extração de proteínas totais

Foram realizadas extrações de proteínas de:

1) cultura de células transfectadas e não transfectadas. As células foram lavadas com 1mL de D-PBS gelado, e depois de retirada a solução de lavagem, foram adicionados 600µL de *RIPA Lysis buffer* (50mM Tris-HCl pH 7,4; 150mM NaCl; 1% Igepal CA-360; 0,25% de dioxíclorato de sódio; 0,1% de SDS 10%; 1mM EDTA pH 8,0 e água q.s.p.10mL) com 1mM de inibidor de protease (*Complete mini* 100mg/mL, EDTA *free* – Roche Corporation Indianópolis, IN, EUA). As células foram lisadas com auxílio de instrumento apropriado (*cell scraper*) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e todo o volume foi colocado em tubo de 1,5mL e incubado a 4°C por 15 minutos. Os produtos de lise celular foram homogeneizados em agitador orbital por 15 minutos a 4°C, e centrifugados a 13500RPM por 15 minutos a 4°C. Todo o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5mL e estocado a -70°C.

2) tecido tireoideano: Triturou-se de 200-300mg de tecido tireoideano e adicionou-se 3mL de K-HEPES (200mM manitol, 80mM HEPES, 41mM KOH, água q.s.p. 2L, e pH 7,5) com 40mg/mL de inibidor de protease. Homogeneizou-se muito bem e centrifugou-se esta solução a 5000RPM a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e armazenado a -70°C para posterior utilização.

Quantificação de proteínas totais

A concentração protéica foi determinada por colorimetria, utilizando o reagente de *Bradford* (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e curva padrão de BSA (albumina de soro bovino - Promega, Madison, WI, EUA). Para a curva foram preparados tubos com concentrações diferentes de BSA (0,5µg; 1µg; 2µg; 4µg; 6µg

e 8µg). As amostras foram diluídas de 1:20 e 10µL foram utilizados na quantificação. Em todos os tubos foram adicionados 50 µL de NaOH 0,1N; 500 µL de reagente de *Bradford* e água para completar 1mL. Todas as amostras foram incubadas por 10 minutos a 25°C para posterior leitura da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro a 595nm (Pharmacia, Uppsala, Suécia).

Dosagem de tireoglobulina

As dosagens de TG secretadas nos sobrenadantes da cultura de células HEK293 transfectadas com os plasmídeos pTGWT e pTGA2215D foram realizadas através de fluoroimunoensaio indireto, empregando-se o estojo comercial *DELFLIA Thyroglobulin (hTg)* (DELFLIA, Wallac, Oy, Turkyu, Finland). Foram realizados dois experimentos de transfecções independentes e determinada a eficiência de transfecção (ET) em cada um deles através da quantificação da expressão do gene da luciferase presente no plasmídeo pGL3, utilizado para co-transfectar as células juntamente com os plasmídeos contendo os genes da TG. O plasmídeo pGL3 foi gentilmente doado por Chin Jia Lin, Prof. do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Eletroforese de proteína e hibridização (*Western Blotting*)

Foram realizadas eletroforeses em gel de acrilamida 5% para análise da TG nos extratos protéicos obtidos de: a) cultura de células TSA201 transfectadas e não transfectadas (controle negativo), e dos seus respectivos sobrenadantes e b) tecidos tireoideanos. Para a normalização da quantidade de proteína nos tecidos tireoideanos foi realizada eletroforese em gel de acrilamida 14% para pesquisa de actina. Foram

empregados 10µg de proteína total dos produtos da lise celular e dos sobrenadantes, previamente concentrados com colunas centricon Millipore YM-100, (Millipore Corporate, MA, EUA); 25,4µg de proteína do tecido tireoideano da paciente ACFM e 50,3µg de proteína extraída de tecido de indivíduo controle (sem doença tireoideana). Cada amostra foi misturada com tampão de carregamento 6x (*loading buffer*) e denaturada a 100°C por 3 minutos. Após aproximadamente 3-5 horas de eletroforese a 122V, as amostras foram transferidas durante 1 hora e 20 minutos para membrana de nitrocelulose de 0,45µm (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, EUA) utilizando-se o equipamento *Transphor Electrophoresis* (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, EUA). Para detecção de TG foram utilizados os anticorpos: 1) anti-tireoglobulina policlonal em coelho (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) na diluição de 1:5000, e anti-imunoglobulina monoclonal de coelho conjugado com peroxidase na diluição de 1:10000 (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, EUA); 2) anti-tireoglobulina monoclonal em camundongo na diluição de 1:500 (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) e anti-imunoglobulina monoclonal de camundongo conjugado com peroxidase na diluição de 1:2000 (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). Para a detecção de actina, o anticorpo primário empregado foi anti-actina monoclonal em camundongo (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) na diluição de 1:500.

Após exposição por aproximadamente 25 segundos e revelação do filme de RaioX (Hyperfilm ECL-Applied Biosystems Corporate, CA, EUA), foi realizada a dosimetria das bandas correspondentes a tireoglobulina e actina através do programa *Molecular Analyst Software* (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, EUA). Os valores da massa de tireoglobulina foram normalizados com os valores de actina.

Imunohistoquímica e microscopia.

A localização celular da TG foi realizada por imunohistoquímica e por microscopia por coloração de hematoxilina/eosina. O tecido da paciente ACFM obtido foi fixado em formol a 4% tamponado, embebido em parafina e seccionado em 3µm com micrótomo rotativo. Os cortes foram colocados sobre lâminas quimicamente tratadas com organosilano para aumentar a aderência. A parafina dos cortes foi retirada por meio de banhos em xilol a 60°C por 5 minutos e a 25 °C por 15 minutos. O material foi re-hidratado após banhos em etanol absoluto, etanol a 95%, etanol a 80% e água destilada. Para pesquisa do antígeno, foi necessário submeter o material à recuperação antigênica por meio de calor úmido sob pressão, empregando-se solução de ácido cítrico 10mM, pH 6, em panela de pressão por três minutos. Após resfriamento, a peroxidase endógena foi bloqueada por incubações em água oxigenada 20 volumes por 20 minutos a 25°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e solução salina tamponada com fosfatos (PBS, 10mM pH 7,4). Seguiu-se etapa de incubação com anticorpo primário policlonal anti-TG humano (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), diluído a 1:1000 em solução diluente (tampão PBS contendo soro-albumina bovina a 1% e azida sódica a 0,1%) por 18 horas a 4° C, em câmara úmida. O material foi lavado três vezes em tampão PBS para retirada dos anticorpos em excesso, e em seguida, foi aplicado o anticorpo secundário biotinilado (*kit LSAB*, Dako, Glostrup, Dinamarca), por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. O material foi novamente submetido a lavagens em PBS, incubado com o amplificador Complexo Estreptavidina-Peroxidase (*Kit LSAB* Dako, Glostrup, Dinamarca) e incubado a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Após mais uma lavagem com PBS, a reação foi revelada com solução contendo substrato a

0,1% (Peróxido de hidrogênio ou água destilada) e cromógeno (100mg Diaminobenzidina; Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), ambos dissolvidos em tampão PBS por 3-5 minutos.

Lâminas também foram levemente contra-coradas com hematoxilina/eosina e desidratadas em banhos de álcoois e xilol para montagem com lamínula e Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Estas análises foram realizadas pelo laboratório de imunohistoquímica, Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

Microscopia eletrônica e microscopia imunoeletrônica

Foi realizada a análise do tecido tireoideano da paciente ACFM através da microscopia eletrônica e da microscopia imunoeletrônica. Para esta última técnica foram empregados os seguintes anticorpos: anti-tireoglobulina monoclonal em camundongo (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) como anticorpo primário e o anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com partículas de ouro coloidal (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) como secundário. Esses experimentos foram realizados pelo setor de Biologia Celular (LIM-59) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Análise da estrutura secundária da proteína mutada

A análise da estrutura secundária da região homóloga a AChE da TG mutada e não mutada foi realizada através do programa PSIPRED *Protein Structure Prediction* (www.bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred).

IV.RESULTADOS

Confirmação do defeito de síntese de tireoglobulina

Foi possível realizar o teste de estímulo com TSHhr para confirmar o defeito de síntese de TG em 11 dos 13 pacientes estudados. Após a injeção de 0,45mg de TSHhr, verificou-se que em todos os pacientes os valores de TG não se elevaram, confirmando o defeito (Tabela 8).

Tabela 8: Valores de TG sérica (ng/mL) antes e após aplicação de 0,45mg de TSHhr intramuscular

Pacientes	TG (ng/mL)		
	Basal	Após 24hs	Após 48hs
ACLBS	6,8	6,4	7,5
MCS	<0,5	<0,5	<0,5
SOP	0,9	1,6	1,9
HS	0,6	<0,5	0,6
JMS	<0,5	<0,5	<0,5
SCS	<0,5	<0,5	<0,5
AM	<0,1	<0,1	<0,1
EM	<0,1	<0,1	<0,1
ASJ	0,8	0,8	0,5
AS	0,7	0,7	0,6
ACFM	3,2	3,5	4,0
Controle*	10,3	29,6	43,2

Níveis de TSH após 24 horas: 12,8-23,0 (μUI/mL).

*Controle: média dos valores de quatro indivíduos, sendo três adultos e uma criança.

Alterações genéticas no gene da tireoglobulina

Neste trabalho foram identificadas: a) cinco mutações, sendo duas novas (Q2142X e IVS46-1G>A) e três (A2215D, R277X e IVS30+1G>T) já descritas na literatura; b) 19 polimorfismos, sete novos, dos quais somente um promove a troca

de aminoácido (N2597S, Q1232Q, D1436D, S1607S, K1935K, L2204L, L2309L, D2495D) e c) 13 alterações nos introns (Tabela 9).

As alterações de sequência Q2142X e IVS46-1G>A não foram encontradas nos 200 cromossomos dos 100 indivíduos controles estudados, confirmando assim estas alterações como mutações.

A análise detalhada da sequência do gene da TG nos 13 pacientes mostrou:

1) Família 1: Paciente ACBL

Nenhuma mutação foi identificada na sequência codificante do gene da TG ou nas junções exon/intron que explique o HC nesta paciente (Figura 6). Porém, foram identificadas seis alterações em introns e 16 polimorfismos (Tabela 9).

Figura 6: Heredograma mostrando alterações genéticas da família 1. A seta indica a paciente ACBL em estudo.

2) Família 2: Paciente MCS

Neste paciente foram identificadas duas mutações: a) substituição de C por T em heterozigose na posição 886 do gene, a qual promoveu a troca de arginina por códon de parada na posição 277 da proteína (R277X) e b) substituição de G por A

em heterozigose na posição -1 do intron 46 (IVS46-1G>A) (Figuras 15 e 16; Tabela 9), definindo uma heterozigose composta. Foram identificados também 11 polimorfismos e três alterações em introns (Tabela 9). A mutação R277X foi detectada em heterozigose na mãe e na avó materna, enquanto que a mutação IVS46-1G>A foi identificada em heterozigose na irmã, no avô paterno e no pai (Figura 7).

Figura 7: Heredograma mostrando alterações genéticas da família 2. A seta indica o paciente MCS em estudo.

3) Família 3: Paciente SOP

Neste paciente foi identificada a mutação 886C>T (R277X) em homozigose (Figura 15 e Tabela 9). Foram identificados também oito polimorfismos e três alterações em introns (Tabela 9). A mutação R277X foi detectada em heterozigose na mãe e na irmã. Não foi realizado o estudo no pai porque não compareceu para coleta de material (Figura 8).

Figura 8: Heredograma mostrando alterações genéticas da família 3. A seta indica o paciente SOP em estudo.

4) Família 4: Pacientes HS e JMS

Nestes dois irmãos foi identificada a substituição de C por T em homozigose na posição 6481 do gene que promoveu a troca de glutamina por códon de parada na posição 2142 da proteína (Q2142X) (Figura 17 e Tabela 9). Foram identificados também, oito polimorfismos e três alterações em introns (Tabela 9). A mutação Q2142X foi detectada em heterozigose nos pais dos pacientes (Figura 9).

Figura 9: Heredograma mostrando alterações genéticas da família 4. As setas indicam os pacientes JMS e HS em estudo.

5) Família 5: Paciente SCS

Nesta paciente foi identificada a mutação 886C>T (R277X) em homozigose (Figura 15 e Tabela 9). Foram identificados também nove polimorfismos e três alterações em introns (Tabela 9). A mutação R277X foi detectada em heterozigose nos pais (Figura 10).

Figura 10: Heredograma mostrando alterações genéticas da família 5. A seta indica a paciente SCS em estudo.

6) Família 6: Paciente LPS

Nesta paciente foi identificada a mutação 886C>T (R277X) em homozigose (Figura 15 e Tabela 9). Foram identificados também 10 polimorfismos e três alterações em introns (Tabela 9). A mutação R277X foi detectada em heterozigose nos pais (Figura 11).

Figura 11: Heredograma mostrando alterações genéticas da família 6. A seta indica a paciente LPS em estudo.

7) Família 7: Paciente WRJ

Neste paciente foram identificadas duas mutações: a) 886C>T (R277X) em heterozigose (Figura 15 e Tabela 9) e b) substituição de C por A em heterozigose na posição 6701 do gene que promoveu a troca de alanina por ácido aspártico na posição 2215 da proteína (A2215D) (Figura 18 e Tabela 9), definindo uma heterozigose composta. Foram identificados também 11 polimorfismos e quatro alterações em introns (Tabela 9). A mutação R277X foi detectada em heterozigose na mãe e na irmã, e a mutação A2215D foi identificada em heterozigose no pai (Figura 12).

Figura 12: Heredograma mostrando alterações genéticas da família 7. A seta indica o paciente WRJ em estudo.

8) Família 8: Pacientes AM, EM, ASJ e AS

Nos pacientes AM e EM foi identificada a substituição de G por T na posição +1 do intron 30 (IVS30+1G>T) em homozigose (Figura 19 e Tabela 9). Além disso, foram identificados nove polimorfismos e três alterações em introns. Esta mutação foi detectada em heterozigose nos pais (Figura 13).

Nos pacientes ASJ e AS foram identificadas duas mutações: a) substituição de G por T na posição +1 do intron 30 (IVS30+1G>T) (Figura 19 e Tabela 9) e b) substituição de C por A em heterozigose na posição 6701 (A2215D) (Figura 18 e Tabela 9), definindo uma heterozigose composta. Foram identificados também 12 polimorfismos e cinco alterações em introns (Tabela 9). A mutação IVS30+1G>T foi detectada em heterozigose no pai e a mutação A2215D em heterozigose na mãe (Figura 13).

Figura 13: Heredograma mostrando alterações genéticas da família 8. As setas indicam os pacientes AM, EM, AS e ASJ em estudo.

9) Família 9: Paciente ACFM

Nesta paciente foi identificada em homozigose a mutação 6701C>A (A2215D) (Figura 18 e Tabela 9). Foram identificados também nove polimorfismos e três alterações em introns (Tabela 9). Esta mutação foi detectada em heterozigose em sua mãe, uma irmã e em seus quatro filhos (Figura 14).

Figura 14: Heredograma mostrando alterações genéticas da família 9. A seta indica a paciente ACFM em estudo.

Cromatograma das mutações identificadas neste estudo

Figura 15: Cromatogramas do sequenciamento do exon 7, onde foi identificada a mutação R277X (886C>T). A) seqüência não mutada. A seta aponta a presença de citosina na posição 886. B) seqüência mutada em homozigose. A seta aponta a presença de timina nessa posição.

Figura 16: Cromatogramas do sequenciamento do exon/intron 46, onde foi identificada a mutação IVS46-1G>A. A) sequência não mutada. A seta aponta a presença de guanina na posição -1 do intron 46. B) sequência mutada em heterozigose. A seta aponta a presença de adenina e guanina na mesma posição.

Figura 17: Cromatogramas do sequenciamento do exon 37, onde foi identificada a mutação Q2142X (6481C>T). A) sequência não mutada. A seta aponta a presença da base citosina na posição 6481. B) sequência mutada em homozigose. A seta aponta a presença de timina na mesma posição.

Figura 18: Cromatogramas do sequenciamento do exon 38, onde foi identificada a mutação A2215D (6701C>A). A) sequência não mutada. A seta aponta a presença de citosina na posição 6701. B) sequência mutada em homozigose. A seta aponta a presença de adenina na mesma posição.

Figura 19: Cromatogramas do sequenciamento do exon/intron 30, onde foi identificada a mutação IVS30+1G>T. A) sequência não mutada. A seta aponta a presença de guanina na posição + 1do intron 30. B) sequência mutada em homozigose. A seta aponta a presença de timina na mesma posição.

Tabela 9: Alterações de sequência do gene da TG identificadas nos pacientes.

Exon/ Intron	Posição no cDNA	Posição no DNA ou proteína	PACIENTES												
			HS	JMS	MCS	LPS	SOP	SCS	WRJ	ACFM	ACLBS	AM	EM	AJS	AS
2		IVS2-26T>C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
3		IVS3+4A>C	A/A	A/A	A/A	A/A	-	-	A/A	-	A/C	A/A	A/A	A/A	A/A
3		IVS3+34C>G	C/C	C/C	C/C	C/C	-	-	C/C	-	C/C	C/C	C/C	C/G	C/G
7		IVS7-4T>G	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/G	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T
7	886C>T	R277X	C/C	C/C	C/T	T/T	T/T	T/T	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
10	2200T>G	S715A	G/T	G/T	G/G	G/G	G/G	G/G	G/T	G/G	G/G	T/T	T/T	G/T	G/T
10	2334T>C	P759P	C/T	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	T/T	T/T	C/T	C/T
12	3082A>G	M1009V	A/A	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	A/A	A/G	A/G
16	3474T>C	S1139S	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
17	3753A>G	Q1232Q	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
18		IVS18-20T>C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	C/C	C/C	T/T	T/T	C/C	C/C
18	3935G>A	G1293D	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	A/A	G/G	G/G
20	4365C>T	D1436D	C/C	C/C	C/C	-	-	-	C/C	-	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C
21	4506C>T	A1483A	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	T/T	T/T	C/T	C/T
22		IVS22-20T>C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T
24		IVS24-31C>T	T/T	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	-	C/C	T/T	T/T	T/T	T/T
24		IVS24-32C>T	T/T	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	-	C/C	T/T	T/T	T/T	T/T
24	4878C>T	S1607S	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C
27		IVS27-30C>T	C/C	C/C	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	-	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C
27		IVS27+59G>C	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	-	C/C	G/G	G/G	G/G	G/G
27		IVS27+62C>G	C/C	C/C	C/C	C/G	C/C	C/C	C/C	-	C/G	C/C	C/C	C/C	C/C

Tabela 9: Alterações de sequência do gene da TG identificadas nos pacientes (continuação).

Exon/ Intron	Posição no cDNA	Posição no DNA ou proteína	PACIENTES													
			HS	JMS	MCS	LPS	SOP	SCS	WRJ	ACFM	ACLBS	AM	EM	AJS	AS	
29	5512A>G	N1819D	A/A	A/A	A/G	A/G	A/A	A/A	A/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	
30		IVS30+1G>T	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	T/T	G/T	G/T	
31	5862A>G	K1935K	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/G	A/A	A/A	A/A	A/A	
33	5995C>T	R1980W	T/T	T/T	T/T	C/T	C/C	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	C/C	C/T	C/T	
36		IVS36+13T>C	T/T	T/T	T/T	-	-	-	T/C	-	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	
37	6481C>T	Q2142X	T/T	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	
38	6701C>A	A2215D	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/A	A/A	C/C	C/C	C/C	C/A	C/A	
38	6669G>A	L2204L	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	
40	6984C>G	L2309L	C/C	C/C	C/G	-	-	-	C/C	C/C	C/G	C/C	C/C	C/C	C/C	
43	7408C>T	L2451L	T/T	T/T	C/T	C/C	C/C	T/T	C/T	T/T	C/C	C/C	C/C	C/T	C/T	
43	7501T>C	W2482R	T/T	T/T	T/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	
43	7539C>T	D2495D	T/T	T/T	C/C	-	-	-	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	
44	7589A>G	Q2511R	A/A	A/A	A/G	G/G	G/G	A/A	A/G	A/A	A/G	G/G	G/G	A/G	A/G	
46		IVS46-1G>A	G/G	G/G	G/A	-	-	-	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	
46	7920C>T	Y2621Y	T/T	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	C/T	C/C	C/T	T/T	T/T	C/T	C/T	
48		IVS48+1A>T	A/A	A/A	A/A	-	-	-	A/T	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	

Vermelho: mutações no gene da TG; **Estilo negrito:** alterações intrônicas; **Estilo normal:** polimorfismos ;** polimorfismo novo com troca de aminoácido.

Efeito fundador

Devido a alta frequência da mutação R277X, identificada em cinco pacientes de diferentes famílias (Minas Gerais), foi pesquisada a presença de um possível ancestral comum (efeito fundador) através do estudo comparativo de 15 SNPs exônicos, dois microsátélites (TGrI29 e TGrI30) e uma inserção/deleção (Indel) de 1464pb no intron 18. Os resultados descritos nas tabelas 10 e 11 mostraram que vários alelos são compartilhados pelos pacientes. Contudo, dois pacientes (SOP e SCS) apresentaram os mesmos 12 SNPs, a inserção de 1464pb no intron 18 e os mesmos tamanhos dos produtos amplificados no estudo dos microsátélites.

Tabela 10: Polimorfismos, inserção/deleção identificados no gene da TG nos pacientes que possuem a mutação R277X.

Exon/Intron	Troca nucleotídeo	Pacientes				
		SCS	SOP	LPS	MCS	WRJ
3	229G>A	<i>G/G</i>	<i>G/G</i>	<i>G/G</i>	<i>G/G</i>	<i>G/G</i>
10	2200T>G	<i>G/G</i>	<i>G/G</i>	<i>G/G</i>	<i>G/G</i>	G/T
10	2334T>C	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	C/T
10	2488C>G	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>
12	3082A>G	<i>G/G</i>	<i>G/G</i>	<i>G/G</i>	<i>G/G</i>	<i>G/G</i>
16	3474T>C	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>
Intron 18	1464pb	<i>I/I*</i>	<i>I/I</i>	<i>I/I</i>	I/D**	<i>I/I</i>
18	3935G>A	<i>G/G</i>	<i>G/G</i>	<i>G/G</i>	<i>G/G</i>	<i>G/G</i>
21	4506T>C	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	C/T	<i>C/C</i>
29	5512A>G	<i>A/A</i>	<i>A/A</i>	A/G	A/G	A/G
33	5995C>T	T/T	C/C	C/T	T/T	T/T
36	6695C>T	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	C/C	C/C	C/C
43	7408C>T	T/T	C/C	C/C	C/T	C/T
43	7501T>C	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	T/T	<i>C/C</i>
44	7589A>G	A/A	G/G	G/G	A/G	A/G
46	7920C>T	<i>T/T</i>	<i>T/T</i>	<i>T/T</i>	C/C	C/T

Em estilo itálico e negrito: mesmos alelos para os SNPs e para a inserção de 1464pb no intron 18, ***I:** inserção de 1464pb, ****D:** deleção de 1464pb

Tabela 11: Microsatélites do gene da TG identificados nos pacientes que possuem a mutação R277X.

Intron	Microsatélites (pb)	Pacientes				
		SCS	SOP	LPS	MCS	WRJ
Intron 29	TGrI 29*	201/201	201/201	199/201	201/197	201/199
Intron 30	TGrI 30**	538/538	538/538	538/542	538/506	538/538

*TGrI29: microsatélite com tamanho entre 197-201pb

**TGrI30: microsatélite com tamanho entre 506-542pb

Estudo funcional da mutação A2215D

Para estudar as consequências funcionais da mutação A2215D, identificada no gene da TG em quatro pacientes, foram realizadas análise da estrutura da proteína *in silico* e diferentes estudos *in vitro*.

1) Análise da proteína *in silico*

Inicialmente foi analisada a estrutura secundária da TG mutada *in silico*, comparado-a com a estrutura da proteína sem mutação. Foi observado que esta mutação poderia causar várias alterações estruturais: a) redução no alongamento da hélice protéica nas posições 2222, 2223, 2606 e 2607 da proteína; b) redução no alongamento na estrutura β -sheet nas posições 2288 e 2361da proteína; c) extensão da hélice protéica nas posições 2421 e 2584 da proteína; d) introdução de β -sheet nas posições 2236, 2237 e 2284 da proteína (Figura 20).

2211 ** ** 2242
PSS:----CCCCCCCCCHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC----
AA: ---GVPY[A]APPLAERRFQAPEPLNWTGSDASKPR---- TG não mutada

2211 ** ** 2242
PSS:---- CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCECCCCC----
AA: ---GVPY[D]APPLAERRFQAPEPLNWTGSDASKPR---- TG mutada

2275 * * 2292
PSS:----CCCCEEEEEECCCCEEEC----
AA: ---PNASVLVFFHNTMDREE ----TG não mutada

2275 * * 2292
PSS:----CCCCEEEEEECCCCEEEC----
AA: --- PNASVLVFFHNTMDREE----TG mutada

2355 * 2371
PSS:----CCCHHHEEEEECCCCCHH----
AA: ---GGDPRRVSLAADRGAD----TG não mutada

2355 * 2371
PSS:----CCCHHHCEEEEECCCCCHH----
AA: ---GGDPRRVSLAADRGAD----TG mutada

2417 * 2431
PSS:----HHHHCCCCCCHHHH----
AA: --- LAKEVSCPMSSSQEV----TG não mutada

2417 * 2431
PSS:----HHHHHCCCCCCHHHH----
AA: --- LAKEVSCPMSSSQEV----TG mutada

2582 * * * 2611
PSS:--- HHCCCCCCEEEEECCCCCCCCCCCCCHHHHHH----
AA:---- WAKRARGNVFMYHAPENYGHGSLELLADVQF----TG não mutada

2582 * * * 2611
PSS:---HHHCCCCCCEEEEECCCCCCCCCCCCCHHHH----
AA:---- WAKRARGNVFMYHAPENYGHGSLELLADVQF----TG mutada

Figura 20: Análise da estrutura secundária da região homóloga a AChE da TG mutada e da TG não mutada. **PSS**: estrutura secundária; **AA**: seqüência de aminoácidos. As caixas indicam a troca do aminoácido alanina (A) por ácido aspártico (D) na posição 2215 da proteína. *: possíveis alterações na estrutura protéica devido à mutação A2215D. **H**: hélix; **C**: coil; **E**: β -sheet.

2) Avaliação da expressão da TG mutada em células de mamífero

Os extratos protéicos intracelulares e dos sobrenadantes coletados 24 e 48 horas após a transfecção das células TSA201 com os plasmídeos pTGA2215D e pTGWT foram analisados por eletroforese em gel de acrilamida 5% e hibridização com anticorpo policlonal anti-TG (*western blotting*). Em todos os experimentos foi utilizado a mesma quantidade de proteína e como controle negativo o produto de lise celular de células TSA201 não transfectadas.

Foi verificado que a TG mutada e a não mutada foram expressas nas células de mamífero e secretadas para os sobrenadantes (Figura 21).

A análise qualitativa das hibridizações mostrou que a TG não mutada foi mais abundante no sobrenadante coletado 48 horas após a transfecção, quando comparada com a do sobrenadante de 24 horas e a do extrato da lise celular (Figura 21). Por outro lado, a TG mutada foi mais abundante no extrato da lise celular do que nos sobrenadantes coletados 24 e 48 horas após a transfecção (Figura 21).

Figura. 21: Hibridização de proteínas com anticorpo específico anti-TG. **pTGWT**) extratos protéicos (10µg) das células transfectadas com o plasmídeo pTGWT; **pTGA2215D**) extratos protéicos (10µg) das células transfectadas com o plasmídeo pTGA2215D. **C**: controle negativo; **L**: extrato protéico da lise celular; **24hs e 48hs**: extratos protéicos dos sobrenadantes coletados 24 e 48 horas após a transfecção respectivamente.

Esta análise também mostrou que tanto a TG mutada quanto a não mutada apresentaram peso molecular semelhante. Não foi possível determinar exatamente o peso molecular das proteínas sintetizadas, pois o monômero da TG apresenta 330 KDa e o dímero 660KDa, e não existe um padrão de peso molecular disponível que permita avaliar tamanhos moleculares tão elevados.

3) Avaliação quantitativa da secreção da tireoglobulina

A TG mutada e não mutada secretadas nos sobrenadantes pelas células HEK293 foram dosadas por fluoroimunoensaio indireto. Foram analisados os sobrenadantes de dois experimentos de transfecções independentes com cada plasmídeo.

A concentração da TG não mutada no sobrenadante de 24 horas após a transfecção foi de 132ng/mL e 49,9ng/mL, em cada experimento. Após 48 horas, verificou-se um importante aumento da secreção de TG para 2450ng/mL e 576ng/mL, respectivamente (Tabela 12). O aumento da secreção após 48hs foi observado tanto no experimento com valor de eficiência transfecção elevado (ET: 328,1), assim como com baixo valor (ET: 37,71) (Tabela 12).

Por outro lado, a TG mutada não foi detectada no sobrenadante coletado 24 horas após a transfecção; enquanto que 48 horas após, os valores de TG secretada foram extremamente baixos: 3,8ng/mL e 2,1ng/mL (Tabela 12). Estes resultados foram obtidos em experimentos com valores de eficiência de transfecção de ET: 161,7UA; 120,3UA, superiores ao obtido com o plasmídeo TG não mutada (ET: 37,71) (Tabela 12).

Tabela 12: Quantificação da TG mutada e não mutada secretada nos sobrenadantes 24 e 48 horas após a transfecção com os plasmídeos pTGWT e pTGA2215D, e seus respectivos valores de eficiência de transfecção.

	TG (ng/mL) secretada		Eficiência de transfecção (UA)
	24 horas	48 horas	
TG não mutada	132	2450	328,1
TG não mutada	49,9	576	37,71
TG mutada	<1,0	3,8	161,7
TG mutada	<1,0	2,1	120,3

4) Estudo da expressão da TG mutada em tecido tireoideano

A quantidade de TG presente no tecido tireoideano da paciente ACFM e em amostra de tireóide controle foi determinada pela dosimetria da banda correspondente, após eletroforese e hibridização com anticorpo específico (Figura 22). Também foi realizada hibridização com anticorpo anti-actina para a normalização dos valores. Os resultados obtidos foram: a) amostra da paciente ACFM: DO de TG: $20,63 \pm 4,80$ UA TG, e DO de actina: $45,25 \pm 4,30$ UA, e b) amostra controle: DO de TG: $65,74 \pm 1,59$ UA, e DO de atina: $15,74 \pm 3,02$ UA. Após normalização, o valor correspondente à TG na amostra da paciente ACFM foi de 0,46UA e na amostra controle foi de 4,18UA. Assim, a quantidade de TG presente no tecido tireoideano da paciente ACFM foi aproximadamente nove vezes menor quando comparado à quantidade de TG presente no tecido do indivíduo controle (Figura 23).

Figura 22: Hibridização com anticorpos específicos para TG (B) e actina (A). **ACFM**: extrato protéico do tecido da paciente portadora da mutação A2215D. **Controle**: extrato protéico de tecido de indivíduo controle. Experimento realizado em quadruplicata.

Figura 23: Valores de TG normalizados com actina no tecido tireoideano da paciente ACFM e de um indivíduo controle.

5) Quantificação da expressão gênica em tecido tireoideano

Inicialmente foi quantificada a expressão gênica da TG por RT-PCR quantitativo em tempo real. A concentração média de RNAm da TG nas duas amostras de tecido tireoideano da paciente ACFM foi de $1648,93 \pm 168,69$ UA (Figura 24). A concentração média de TG de 10 amostras de tecido tireoideano de indivíduos controles (sem doença tireoideana) foi de $6062,92 \pm 1308,26$ UA (Figura 24). Sendo assim, no tecido tireoideano da paciente ACFM a concentração de RNAm de TG foi 3,68 vezes menor que nas amostras de tecidos dos indivíduos controles.

Figura 24: Concentração média (UA) de RNAm de TG nas amostras de indivíduos controles e da paciente ACFM.

Posteriormente foi analisada a expressão de outros genes de tireóide (TPO, NIS, TTF-1, PAX-8 e rTSH) também por RT-PCR quantitativo em tempo real. A concentração de RNAm de cada um dos genes no tecido da paciente ACFM foi: a) TPO: 0,28UA; b) TTF-1: 0,04UA; c) NIS: 0,05; d) PAX-8: 0,10 e d) rTSH: 0,16 UA. Quando estes valores foram comparados com a amostra de indivíduo controle foi

possível verificar que a expressão de todos os genes estudados estava diminuída (Figura 25).

Figura 25: Redução da expressão dos genes TG, TPO, NIS, PAX-8, TTF-1 e rTSH no tecido tireoideano da paciente ACFM em relação a expressão no tecido tireoideano de indivíduo controle.

6) Análise da localização da TG no tecido tireoideano

A localização da TG no tecido tireoideano da paciente ACFM foi estudada por imunohistoquímica, microscopia por coloração de hematoxilina/eosina, microscopia eletrônica e microscopia imunoeletrônica.

O estudo imunohistoquímico mostrou positividade para TG no interior do tireócito no tecido da paciente ACFM (Figura 26A). Não foi detectada TG no colóide, como foi observada em amostra de tecido tireoideano controle (Figura 26B). Este resultado foi compatível com o obtido pela microscopia por coloração de hematoxilina/eosina, onde se verificou que a proteína estava praticamente ausente no colóide do folículo tireoideano da paciente ACFM (Figura 27A). Por outro lado, em

amostra de tecido controle foi verificada a presença da TG em praticamente todo o colóide (Figura 27B).

Figura 26: Localização da TG por imunohistoquímica com anticorpo policlonal anti-TG. A) tecido tireoideano da paciente ACFM. A seta aponta a positividade da TG dentro do tireócito. B) tecido tireoideano de indivíduo controle. A seta aponta a positividade da TG no colóide do folículo.

Figura 27: Localização da TG por microscopia por coloração de hematoxilina/eosina. A) tecido tireoideano da paciente ACFM. A seta aponta a ausência da TG no colóide do folículo tireoideano. B) tecido tireoideano de indivíduo controle. A seta aponta a presença da TG no colóide do folículo.

7) Microscopia Eletrônica

Através da microscopia eletrônica foi possível identificar um significativo aumento no tamanho do RER no tecido tireoideano da paciente ACFM, quando comparado com o tecido controle (Figura 28). Este resultado sugere que a TG poderia estar retida no RER, justificando o aumento de tamanho desta estrutura.

Figura 28: Localização da TG pela técnica de microscopia eletrônica. A) tecido tireoideano da paciente ACFM. A seta aponta RER de tamanho aumentado. A integridade das estruturas pôde ser comprovada pela identificação de mitocôndrias (M). B) tecido tireoideano de indivíduo controle. A seta aponta um RER de tamanho normal.

8) Microscopia imunoelétrica

A análise do tecido tireoideano da paciente ACFM pela técnica de microscopia imunoelétrica revelou a positividade da TG dentro de grandes vacúolos, possivelmente RER (Figura 29A). Para confirmar a especificidade do anticorpo, utilizou-se como controle negativo à exposição do tecido da paciente somente com o anticorpo secundário, o qual não reagiu com nenhuma outra partícula diferente de TG (Figura 29B).

Figura 29: Localização da TG por microscopia imunoelétrica. A) Tecido tireoideano da paciente ACFM. As setas apontam a positividade (pequenos pontos pretos) da TG dentro de grandes vacúolos (possivelmente RER). B) Tecido tireoideano da paciente ACFM. Hibridização somente com anticorpo secundário como controle negativo. Notar ausência de positividade.

V.DISSCUSSÃO

A integridade funcional da TG presente nas células tireoideanas é essencial para assegurar a síntese dos hormônios e evitar assim, o aparecimento do hipotireoidismo. Com o objetivo de aprofundar o conhecimento sobre esta importante proteína, este estudo visou identificar mutações no gene da TG em 13 pacientes brasileiros com hipotireoidismo congênito por provável defeito na síntese de TG e verificar o efeito funcional *in vitro* da mutação A2215D identificada.

Estudos na literatura relatam que pacientes com HC por defeito na síntese de TG apresentam fenótipo variável com bócio congênito, hipotireoidismo ou eutireoidismo, elevada captação de I^{131} , organificação normal de iodeto, valores de TSH elevados, com níveis baixos ou normais de T4 e T3 e níveis baixos ou indetectáveis de TG (Medeiros-Neto et al, 2002; Knobel & Medeiros-Neto, 2003). Até o momento, 38 mutações inativantes do gene da TG e associadas ao HC foram identificadas (Rivolta et al, 2006). Estas mutações variam de deleções de exons inteiros a mutações pontuais que alteram a estrutura protéica.

Inicialmente, foi confirmado o defeito de síntese de TG em 11 dos 13 pacientes incluídos neste estudo através do teste de estímulo com TSHhr (Fugazzola et al, 2003a). Em todos os casos, verificou-se que os valores de TG sérica não se elevaram quando comparados com os valores basais. Apenas uma paciente (ACLB) apresentou valores basais de TG sérica dentro do limite da normalidade (6,8ng/mL, referência normal:1,5 a 15ng/mL), porém, após estímulo com TSHhr os valores de TG não se alteraram significativamente. Nesta paciente não foi identificada nenhuma mutação na sequência codificante do gene da TG, nem nas junções exon/intron que

justificasse a não resposta ao estímulo com TSHr e o hipotireoidismo. A presença de alterações na região promotora do gene da TG ou em outras regiões intrônicas poderia explicar o fenótipo da paciente.

Através do sequenciamento dos 48 exons e das junções exon/intron do gene da TG nos 13 pacientes foram identificadas: a) duas novas mutações (Q2142X e IVS46-1G>A); b) três mutações já descritas na literatura (R277X, A2215D e IVS30+1G>T) (Rivolta et al 2006; Caputo et al, 2007); c) 19 polimorfismos, sendo 7 identificados pela primeira vez na população brasileira e; c) 13 alterações em introns (Tabela 9).

A mutação *nonsense* R277X foi a mais freqüente na população estudada. Esteve presente em homozigose em três pacientes (SOP, SCS e LPS) e em heterozigose em outros dois (WRJ e MCS), os quais também apresentaram, respectivamente, as mutações heterozigóticas A2215D e IVS46-1G>A, definindo heterozigose composta (Figuras 7, 8, 10, 11, 12). Outro caso de heterozigose composta foi detectado nos irmãos ASJ e AS, os quais apresentaram as mutações A2215D e IVS30+1G>T (Figura 13). Esta última alteração (IVS30+1G>T) também foi presente em outros dois irmãos (EM e AM), em homozigose (Figura 13). A mutação A2215D em homozigose foi detectada em somente uma paciente (Figura 14). Já a alteração Q2142X foi detectada em homozigose em dois irmãos (HS e JMS) (Figura 9).

É importante observar que em 12 dos 13 pacientes, com HC por provável defeito de síntese de TG, foram identificadas mutações bialélicas (homozigóticas ou em heterozigose composta) no gene da TG. Diferentemente ocorre nos casos de defeitos genéticos de TPO (o mais freqüente na disormonogênese), no qual verifica-

se que aproximadamente 17% dos pacientes apresentam mutações monoalélicas (Fugazzola, et al 2003b). É importante ressaltar que o modo de herança das mutações nos genes da TPO e TG é autossômico recessivo (Knobel & Medeiros-Neto, 2003).

Como comentado anteriormente, a mutação mais freqüente foi a R277X, a qual é causada pela substituição de citosina por timina na posição 886 do gene, que promove a troca de arginina por códon de parada na posição 277 da proteína traduzida (276 aminoácidos) (Figura 30B). Esta mutação foi descrita pela primeira vez em 1999, em família brasileira com três indivíduos afetados com genótipo homozigótico (van de Graff et al, 1999b). Sabe-se que, a glicosilação da TG é um processo essencial que permite sua migração do RER para o complexo de Golgi. Estudos *in vitro* mostraram que a TG mutada de 26KDa pode ser glicosilada, permitindo sua exportação parcial para o colóide (van de Graaf et al, 1999b). Por outro lado, análises por RT-PCR excluíram o mecanismo de *splicing* alternativo, que eliminaria o códon de parada e daria continuidade à tradução da proteína (Gutnisky et al, 2004; Rivolta et al, 2005). Sabe-se também que esta proteína, mesmo sendo de tamanho menor (26KDa), ainda possui o sítio receptor de tirosina na posição 5 (exon 2) e o doador de tirosina na posição 130 (exon 4), o que permitiria a produção (em menor escala) de T4 no domínio N-terminal da proteína (Palumbo et al, 1990; Dunn et al, 1998). Contudo, a quantidade de hormônio produzida nos pacientes portadores da mutação não é suficiente para atingir o eutireoidismo.

Por esta mutação (R277X) ter sido presente em cinco de oito pacientes oriundos de um mesmo estado brasileiro (Minas Gerais) foi realizada a pesquisa de possível ancestral comum (efeito fundador). Para isto, foram analisados 15 SNPs, dois microsatélites (TGrI29 e TGrI30) e um Indel de 1464pb no intron 18. Rivolta et

al (2005) mostraram que estas alterações de sequência poderiam ser informativas na investigação da presença de um ancestral comum em indivíduos portadores da mutação R277X. A análise destes polimorfismos nos cinco pacientes de Minas Gerais mostrou que dois pacientes (SCS e SOP) apresentaram os mesmos haplótipos de 12 polimorfismos, localizados nos 30 primeiros exons do gene, a inserção de 1464pb no intron 18 e os mesmos microsatélites (Tabelas 11 e 12). No mesmo estudo, Rivolta et al (2205) compararam os haplótipos de dois pacientes com a mutação R277X, sendo um oriundo da Argentina e outro do Brasil. Neste caso os autores consideraram que não houve um ancestral comum. Eles sugerem que como esta mutação ocorre em um dinucleotídeo CpG, poderia ser causada pela deaminação da citosina metilada que é reconhecida como timina durante a duplicação do DNA. Sendo assim, o códon CGA (arginina) poderia ser considerado um *hot spot* para mutações no DNA de mamíferos. Para uma melhor conclusão da existência ou não de um ancestral comum entre os pacientes de Minas Gerais seria necessário pesquisar maior número de marcadores genéticos nos pacientes, além de um estudo populacional no estado de Minas Gerais.

Em dois pacientes da mesma família (Figura 9) foi identificada a nova mutação *nonsense* Q2142X, a qual é causada pela substituição de citosina por timina na posição 6481 do gene da TG, promovendo a troca de glutamina por códon de parada prematuro na posição 2142 da proteína (Figura 30C). Esta nova alteração de sequência foi confirmada como mutação pela sua ausência em 200 cromossomos de 100 indivíduos controles (sem doença tireoideana). Esta proteína, mesmo sendo de tamanho menor, poderia ser capaz de manter a habilidade de sintetizar T4 devido à presença de três sítios doadores (posições 130, 847 e 1448) e dois receptores

(posições 5 e 1291) de tirosina. Porém, a mutação localiza-se na unidade repetitivo tipo III da proteína, a qual está relacionada com o mecanismo de glicosilação, processo importante para a exportação da TG para o complexo de Golgi como visto anteriormente. Para um melhor entendimento do possível efeito da mutação na função da proteína, novos estudos, como por exemplo, a verificação *in vitro* da glicosilação, a análise do tamanho do RNAm por RT-PCR e a transfecção de plasmídeos contendo o cDNA da TG mutada em células de mamíferos seriam necessários.

A mutação no intron 30 (IVS30+1G>T) identificada neste estudo em quatro pacientes já foi descrita anteriormente pelo nosso grupo em outra família brasileira (Targovnik et al 2001). É causada pela substituição de guanina por timina na posição +1 do intron 30 (sítio doador de *splice*) (Figura 30D). Sabe-se que, mutações em sítio doador (GT) ou receptor (AG) de *splice* podem causar o chamado *splicing* aberrante no RNAm. A alteração deste mecanismo no RNAm da TG foi descrita pela primeira vez por Ieiri et al (1991), quando verificaram que a substituição de citosina por guanina na posição -3 do intron 3 promoveu a síntese de RNAm de tamanho menor, devido à perda do exon 4. Nosso grupo, em trabalhos anteriores, realizou amplo estudo para confirmar o efeito desta mutação na célula tireoideana. Targovnik et al (1995) verificaram, através do tecido da paciente, que esta mutação promoveu a perda de 138 nucleotídeos, correspondentes ao exon 30. Esta perda resultou na deleção de 46 aminoácidos localizados na região tipo III da proteína, envolvida no mecanismo de glicosilação. Medeiros-Neto et al (1996) mostraram redução da quantidade de TG presente no tecido tireoideano de paciente portador da mutação IVS30+1G>T quando comparado ao tecido controle. Os autores verificaram também

que, a TG extraída de tecido de paciente foi sensível ao tratamento com endoglicosidase H (enzima que digere somente manoses que não foram modificadas pelo complexo de Golgi), indicando que não houve migração da TG do RER para o complexo de Golgi. Estes resultados juntamente com o resultado da microscopia eletrônica, que revelou um RER de tamanho alterado, provaram haver diminuição da exportação de TG para o colóide, ficando retida no RER e causando a doença de acúmulo no retículo endoplasmático (ERSD - *endoplasmic reticulum storage disease*) (Kim & Arvan, 1998). As ERSDs promovem a ativação da resposta a proteínas com alteração estrutural UPR (*unfolded protein response*), responsável pela manutenção da homeostase do RER perturbado pelo acúmulo de proteínas mal estruturadas (Kaufman, 2002). O sistema UPR ativa a tradução de proteínas chaperonas, responsáveis pelo controle de qualidade do RER que verificam a integridade das proteínas sintetizadas impedindo sua exportação caso sejam defeituosas. Além disso, diminui a tradução das proteínas acumuladas (Bertolotti et al, 2000).

No presente estudo, a paciente EM, portadora da mutação IVS30+1G>T em homozigose, teve o diagnóstico de bócio fetal confirmado quando sua mãe estava com 26 semanas de gestação (Figura 4). Segundo relatos da própria mãe, seu primeiro filho, AM, portador da mesma mutação em homozigose, também apresentou bócio fetal, mas exames confirmatórios neonatais não foram realizados na época. O bócio fetal pode também ser causado por diversos fatores maternos, como por exemplo: excesso ou deficiência de iodo, ingestão de medicamentos que afetam a tireóide e doenças tireoideanas auto-imunes (Mestman 1999; Polak et al, 2004; Dallas 2003; Ghazi et al, 2005). Nenhum destes fatores mencionados acima esteve

presente durante a gestação. Sendo assim, o bócio fetal poderia ser consequência do defeito genético IVS30+1G>T, que causou severa deficiência funcional na tireóide do feto durante seu desenvolvimento.

Uma nova mutação intrônica identificada em um paciente, em heterozigose, foi a IVS46-1G>A, causada pela substituição de guanina por adenina na posição -1 do intron 46, região não transcrita e sinalizadora de *splice* (Figura 30E). Esta nova alteração de sequência pôde ser considerada mutação, pois não foi identificada em 200 cromossomos de 100 indivíduos brasileiros utilizados como controles (não afetados). As consequências funcionais desta mutação na proteína poderiam ser as mesmas já descritas para mutações de intron, as quais seriam confirmadas através do estudo funcional, como realizado por Gutnisky et al (2005). Estes autores verificaram a existência de *splicing* aberrante no RNAm da TG através da construção e expressão de minigenes contendo a mutação IVS34-1G>C por eles identificada.

Estudo funcional da mutação A2215D

A mutação *missense* A2215D, identificada em quatro pacientes, foi a escolhida para estudo funcional. Esta mutação é causada pela substituição de citosina por adenina na posição 6701 do gene da TG e promove a troca de alanina por ácido aspártico na posição 2215 da proteína (Figura 30F).

Esta alteração ocorre na região de homologia com a AChE, a qual funciona como domínio de dimerização da TG, facilitando seu transporte intracelular (Park & Arvan, 2004). Caputo et al (2007), através do alinhamento de seqüências, verificaram que o resíduo alanina na posição 2215 da proteína é conservado tanto na TG quanto na AChE da maioria das espécies analisadas.

Neste trabalho, o estudo da proteína mutada iniciou-se com a análise *in silico* da estrutura secundária da região de homologia com a AChE da TG, a qual mostrou que a mutação A2215D poderia promover alterações estruturais que, conseqüentemente, acarretariam em modificações conformacionais da estrutura terciária ou quaternária da proteína (Figura 20). Para a confirmação destas alterações estruturais, moduladas pela mutação A2215D, seria necessário comparar a estrutura da TG mutada com modelo da TG selvagem cristalizada, ainda não disponível em banco de dados. Estudos já descritos na literatura provaram que outras mutações *missense*, presentes em camundongo *cog/cog* e rato *rdw*, na região de homologia com AChE promoveram a retenção da TG dentro do RER, impedindo sua exportação para o colóide e causando o hipotireoidismo (Kim et al, 1998 e Hishinuma et al, 2000).

Para um melhor entendimento das conseqüências da mutação A2215D nas células tireoideanas foram realizados diversos estudos *in vitro*. Este é o primeiro estudo a avaliar a expressão da TG em células de mamífero através de transfecções de plasmídeos contendo o cDNA completo (8,5Kb) da TG humana. Através de eletroforese e hibridização com anticorpo específico, foi verificado que a TG não mutada foi mais abundante nos sobrenadantes coletados 48hs após a transfecção que nos de 24hs ou no conteúdo intracelular (Figura 21). Em contra partida, a TG mutada foi mais abundante no extrato da lise celular do que nos sobrenadantes (Figura 21). Estes resultados sugeriram que a mutação A2215D promove deficiência de secreção de TG, ficando retida dentro da célula de mamífero. Para confirmação desta hipótese, foi realizada a análise quantitativa da TG mutada e não mutada nos sobrenadantes coletados 24 e 48 horas após a transfecção. A dosagem de TG confirmou a baixa

secreção de TG mutada em ambos sobrenadantes (TG de 24hs foi indetectável; TG de 48hs foi 3,8ng/mL e 2,1ng/mL) quando comparados com os valores obtidos nos sobrenadantes da proteína não mutada (TG de 24hs 132ng/mL e 49,9ng/mL; TG de 48hs foi 2450ng/mL e 576ng/mL) (Tabela 12). Esses resultados foram confirmados em dois experimentos e se mostraram independentes da eficiência de transfecção. Fato que pôde ser observado claramente no segundo experimento, no qual a eficiência de transfecção da TG mutada foi três vezes maior do que a eficiência de transfecção da TG não mutada e, mesmo assim, a quantidade de proteína dosada no sobrenadante foi extremamente baixa (Tabela 12).

Os resultados obtidos até o momento indicaram que a TG mutada estaria retida dentro da célula. Portanto, foi pesquisada a localização da TG no tecido tireoideano da paciente ACFM portadora da mutação. Tanto a imunohistoquímica quanto a coloração por hematoxilina/eosina mostraram que a TG mutada localizava-se dentro do tireócito, havendo ausência quase que completa da mesma no colóide. Para determinar sua localização intracelular foi realizada microscopia eletrônica, a qual revelou um RER de volume significativamente aumentado, indicando a retenção da TG dentro desta organela (Figura 28A). Foi realizada também microscopia imunoelétrica, e embora as estruturas visualizadas não estivessem totalmente preservadas, foi possível detectar a positividade para TG dentro de grandes vacúolos, possivelmente RER. Estes resultados sugeriram que a TG mutada ficaria retida no RER devido ao rigoroso controle de qualidade, causando ERSD e hipotireoidismo.

Para pesquisar a síntese de TG no tecido tireoideano da paciente ACFM foi realizada a quantificação da proteína através de eletroforese, hibridização com anticorpo para TG e dosimetria. Verificou-se que a quantidade de TG no tecido

tireoideano da paciente foi aproximadamente nove vezes menor quando comparada com a do tecido do indivíduo controle (Figura 22). Resultado similar foi observado por Hishinuma et al (1999) em paciente com a mutação C1977S. Baryshev et al (2004), consideraram duas diferentes explicações para este resultado: a) a TG mutada apresentaria maior susceptibilidade de degradação pela presença de possíveis alterações estruturais. No entanto, estes autores não identificaram nenhum fragmento proteolítico que provasse esta hipótese e b) em pacientes com ERSD, causada por mutações no gene da TG, a proteína mutada se agregaria com as chaperonas e formaria moléculas de alto peso molecular que não seriam detectadas na eletroforese denaturante. Contudo, estes autores não pesquisaram os níveis de RNAm de TG no tecido tireoideano destes pacientes. Sendo assim, no presente estudo foi avaliada a expressão gênica de TG no tecido tireoideano da paciente ACFM por RT-PCR quantitativo em tempo real. Esta análise mostrou que a quantidade de RNAm da TG no tecido tireoideano da paciente foi 3,68 vezes menor que nas amostras de tecidos dos indivíduos controles. Para complementar este estudo, foi pesquisada também a expressão de outros genes de tireóide (TPO, NIS, TTF-1, PAX-8 e rTSH) por RT-PCR quantitativo em tempo real. Foi possível verificar significativa redução da expressão de todos estes genes quando comparado com a de indivíduo controle. Suzuki et al (2006) mostraram que a TG exógena, acumulada no lúmen folicular, atua como um potente supressor da expressão gênica de fatores de transcrição da tireóide (TTF-1, TTF-2 e PAX-8), que conseqüentemente reduzem a expressão de outros genes expressos na glândula (TPO, NIS e rTSH), inclusive a TG.

Diante do conjunto dos resultados obtidos através do estudo funcional da mutação A2215D, o qual mostrou diminuição da secreção protéica, ausência de TG

no colóide, retenção da TG no RER, baixos valores de RNAm de TG e redução da sua respectiva síntese protéica e baixos valores de RNAm de outros genes de tireóide, pode-se formular a seguinte hipótese: a TG endógena teria ação regulatória na função da célula tireoideana tanto a nível transcricional como traducional, através de pelo menos dois mecanismos:

- 1) mecanismo de auto-regulação: o acúmulo da proteína mutada no RER ativaria a resposta adaptativa celular UPR, a qual bloqueia, parcialmente, a tradução da própria TG;
- 2) mecanismo de regulação via fatores de transcrição: a TG endógena reduziria a expressão dos fatores de transcrição (TTF-1, TTF-2 e PAX-8) através da sua ligação aos respectivos promotores e, conseqüentemente, haveria redução da expressão dos genes de tireóide, inclusive da própria TG.

Finalmente, a TG mutada seria transcrita e traduzida na célula folicular tireoideana, porém não seria secretada para o colóide, ficando retida no RER. Todavia, em alguns pacientes, este fenômeno não seria total e permanente. Ocasionalmente é plausível aceitar-se que algumas moléculas de TG mutada passariam pelo controle rígido do RER, migrariam para o colóide sendo rapidamente hidrolisada liberando hormônios tireoideanos na circulação. Estes pacientes teriam condições de hipotireoidismo atenuado com possibilidade de desenvolvimento psíquico e somático relativamente próximo ao normal, comparativamente a outros em que tal conjunto de eventos não ocorre.

A) TG selvagem

B) R277X

C) Q2142X*

D) IVS30+1G>T

E) IVS46-1G>A*

F) A2215D

Figura 30: representação esquemática dos efeitos causados pelas mutações, descritas neste estudo, na proteína. * possíveis efeitos funcionais baseados na literatura.

Y: sítios receptores de tirosina, y: sítios doadores de tirosina.

VI.CONCLUSÕES

1-A maioria dos pacientes com diagnóstico de hipotireoidismo congênito com bócio e valores de TG sérica baixos ou indetectáveis, mesmo após estímulo com TSHhr, apresentaram mutações bialélicas (em homozigose ou em heterozigose composta) no gene da tireoglobulina.

2-Todas as mutações identificadas neste estudo explicaram o hipotireoidismo congênito diagnosticado nos pacientes.

3-A mutação IVS30+1G>T promoveu defeito muito grave de síntese de tireoglobulina, afetando a glândula tireoideana já na vida intra-uterina (bócio fetal e hipotireoidismo).

4-A mutação A2215D levou a retenção da TG no retículo endoplasmático rugoso e diminuiu sua secreção para o colóide, ocasionando grave defeito de síntese hormonal e hipotireoidismo.

5-A TG endógena, portadora da mutação A2215D, regularia a função tireoideana via supressão da expressão dos fatores de transcrição da tireóide, além de diminuir a síntese protéica no nível de transcrição.

VII.REFERÊNCIAS

Abramowicz MJ, Targovnik HM, Varela V, Cochaux P, Krawiec L, Pisarev MA, Propato FV, Juvenal G, Chester HA, Vassart G. Identification of a Mutation in the Coding Sequence of the Human Thyroid Peroxidase Gene Causing Congenital Goiter. *J. Clin. Invest.* 1992;90:1200–4.

Alzahrani AS, Baitei EY, Zou M, Shi Y. Metastatic thyroid follicular carcinoma arising from congenital goiter due to a novel splice donor site mutation in the thyroglobulin gene. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 2006;91:740–6.

Applied Biosystems, *User Bulletin # 2, ABI Pism 7700 Sequence Detection System*, 1997. Disponível em www.core-facility.uni-freiburg.de/lc480/lc480obj/ub2.

Arvan P, Di Jeso B. Thyroglobulin structure, function, and biosynthesis. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. *Werner and Ingbar's. The thyroid: a fundamental and clinical text*. 9th ed. Philadelphia: *Lippincott Williams and Wilkins*. 2005. p. 77-95.

Baas F, Bikker H, Geurts van Kessel A, Melsert R, Pearson PL, de Vijlder JJ, van Ommem GJ. The human thyroglobulin gene: a polymorphic marker localized distal to c-myc on chromosome band q24. *Hum. Genet.* 1985;69:138–45.

Bakker B, Bikker H, Vulsma T, de Randamie JSE, Wiedijk BM, de Vijlder JJM. Two decades of screening for congenital hypothyroidism in the Netherlands : TPO gene mutations in total iodide organification defect (an update). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000;85:3708–12.

Bakker B, Bikker H, Hennekam RCM, Lommen EJ, Schipper MG, Vulsma T, de Vijlder JJ. Maternal isodisomy for chromosome 2p causing severe congenital hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:1164–8.

Baryshev M, Sargsyan E, Wallin G, Lejnieks A, Furudate S, Hishinuma A, Mkrtchian S. Unfolded protein response is involved in the pathology of human congenital hypothyroid goiter and rat non-goitrous congenital hypothyroidism. *J. Mol. Endocrinol.* 2004;32:903–20.

Bertaux F, Noël M, Malthiery Y, Fragu P. Demonstration of a heterogeneous transcription pattern of thyroglobulin mRNA in human thyroid tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991;178:586–92.

Bertaux F, Noël M, Lasmoles F, Fragu P. Identification of the exon structure and four alternative transcripts of the thyroglobulin-encoding gene. *Gene* 1995;156:297–301.

Bertollotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of Bip and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell. Biol.* 2000; 2: 326-332.

Bikker H, den Hartog MT, Baas F, Gons MH, Vulsma T, de Vijlder JJ. A 20 basepair duplication in the human thyroid peroxidase gene results in a total iodide organification defect and congenital hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994;79:248-52.

Bikker H, Vulsma T, Baas F, de Vijlder JJ. Identification of five novel inactivating mutations in the human thyroid peroxidase gene by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum. Mutat.* 1995; 6:9-16.

Bikker H, Waelkens JJJ, Bravenboer B, de Vijlder JJ. Congenital hypothyroidism caused by a premature termination signal in exon 10 of the human thyroid peroxidase gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996;81:2076-9.

Borck G, Roth C, Martiné U, Wildhardt G, Pohlenz J. Mutations in the PDS gene in german families with Pendred's syndrome: V138F is a founder mutation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003;88:2916-21.

Borck G, TopalogluAK, Korsch E, Martine U, Wildhardt G, Onenli-Mungan N, Bilgin Yuksel B, Aumann U, Koch G, Ozer G, Pfäffle R, Scherberg NH, Refetoff S, Pohlenz J. Four new cases of congenital secondary hypothyroidism due to a splice site mutation in the thyrotropin- β gene: phenotypic variability and founder effect. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004;89:4136-41.

Caputo M, Rivolta CM, Esperante SA, Gruñeiro-Papendieck L, Chiesa A, Pellizas CG, González-Sarmiento R, Targovnik HM. Congenital hypothyroidism with goitre caused by new mutations in the thyroglobulin gene. *J. Endocrinol.* 2007; 195:166-177

Caron P, Moya CM, Malet D, Gutnisky VJ, Chabardes B, Rivolta CM, Targovnik HM. Compound heterozygous mutations in the thyroglobulin gene (1143delC and 6725G→A[R2223H]) resulting in fetal goitrous hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003;88:3546-53.

Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P, Crisp MS, John R, Lazarus JH, Ludgate M, Chatterjee VK. Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat. Genet.* 1998;19:399-401.

Congdon T, Nguyen LQ, Nogueira CR, Habiby RL, Medeiros-Neto G, Kopp P. A novel mutation (Q40P) in PAX8 associated with congenital hypothyroidism and thyroid hypoplasia: evidence for phenotypic variability in mother and child. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:3962-7.

Coyle B, Coffey R, Armour JAL, Gausden E, Hochberg Z, Grossman A, Britton K, Pembrev M, Reardon W, Trembath R . Pendred syndrome (goitre and sensorineural

hearing loss) maps to chromosome 7 in the region containing the nonsyndromic deafness gene DFNB4. *Nat. Genet.* 1996; 12:421-3.

Dallas JS. Autoimmune thyroid disease and pregnancy: Relevance for the child. *Autoimmunity.* 2003; 36:339-350.

Desphande, V & Venkatesh, S.G. Thyroglobulin, the prothyroid hormone: chemistry, synthesis and degradation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1430 157-178.

De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE, Miot F. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J.Biol.Chem.*2000; 275 (30) 23227-23233.

Dohán O, De la Vieja A, Carrasco N. Molecular study of the sodium iodide symporter (NIS): a new field in thyroidology. *Trends. Endocrinol. Metab.* 2000;11:99-105.

Dunn AD, Corsi CM, Myers HE, Dunn JT. Tyrosine 130 is a important outer ring donor for thyroxine formation in thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* 1998;273:25223-9.

Dunn JT, Dunn AD. Thyroglobulin: chemistry, biosynthesis, and proteolysis. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. *Werner and Ingbar's The thyroid: a fundamental and clinical text.* 8th ed. Philadelphia: *Lippincott Williams and Wilkins*; 2000. p. 91-104.

Fugazzola L, Persani L, Mannavola D, Reschini E, Vannucchi G, Weber G, Beck-Peccoz P. Recombinant human TSH testing is valuable tool for differential diagnosis of congenital hypothyroidism during L-Thyroxine replacement. *Clin Endocrinol.*2003a; 59 (2): 230-236.

Fugazzola L, Cerutti N, Mannavola D, Vannucchi G, Fallini C, Persani L, Beck-Peccoz P. Monoallelic Expression of Mutant Thyroid Peroxidase Allele Causing Total Iodide Organification Defect. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003b; 88: 3264-3271

Ghazi AM, Ordookhani A, Pourafkari M, Fallahian M, Bahar A, Hedayati M, Hafizi A, Azizi F. Intrauterine diagnosis and management of fetal goitrous hypothyroidism: a report of an Iranian family with three consecutive pregnancies complicated by fetal goiter. *Thyroid* 2005; 15: 1341-47.

Gnidehou S, Caillou B, Talbot M, Ohayon R, Kaniewski J, Noel-Hudson MS, Morand S, Agnangji D, Sezan A, Courtin F, Virion A, Dupuy C. Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site. *FASEB J.* 2004 Oct;18(13):1574-6.

Grasberger H, Refetoff S. Identification of the Maturation Factor for Dual Oxidase: Evolution of an eukaryotic operon equivalent. *J. Biol. Chem.* 2006; 281 (27) 18269-18272.

Gutnisky VJ, Moya CM, Rivolta CM, Domené S, Varela V, Toniolo JV, Medeiros-Neto G, Targovnik HM. Two distinct compound heterozygous constellation (R277X / IVS34-1GNC and R277X / R1511X) in the thyroglobulin (TG) gene in affected individuals of a brazilian kindred with congenital goiter and defective TG synthesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004;89:646–57.

Hammond, C & Helenius, A. Quality control in the secretory pathway. *Current Opinion in Cell. Biology* 1995; 7: 523-529.

Hishinuma A, Takamatsu J, Ohyama Y, Yokozawa T, Kanno Y, Kuma K, Yoshida S, Matsuura N, Ieiri T. Two novel cysteine substitutions (C1263R and C1995S) of thyroglobulin cause a defect in intracellular transport of thyroglobulin in patients with congenital goiter and the variant type of adenomatous goiter. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999;84:1438–44.

Hishinuma A, Furudate S-I, Masamichi O-I, Nagakubo N, Namatame T, Ieiri T. A novel missense mutation (G2320R) in thyroglobulin causes hypothyroidism in rdw rats. *Endocrinology* 2000;141:4050–5.

Hishinuma A, Fukata S, Kakudo K, Murata Y, Ieiri T. High incidence of thyroid cancer in long-standing goiters with thyroglobulin mutations. *Thyroid* 2005;15:1079–84.

Hishinuma A, Fukata S, Nishiyama S, Nishi Y, Oh-Ishi M, Murata Y, Ohyama Y, Matsuura N, Kasai K, Harada S, Kitanaka S, Takamatsu J, Kiwaki K, Ohye H, Uruno T, Tomoda C, Tajima T, Kuma K, Miyauchi A, Ieiri T. Haplotype analysis reveals founder effects of thyroglobulin gene mutations C1058R and C1977S in Japan. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006; 91 (8); 3100-4.

Ieiri T, Cochaux P, Targovnik HM, Suzuki M, Shimoda S, Perret J, Vassart G. A 3' splice site mutation in the thyroglobulin gene responsible for congenital goiter with hypothyroidism. *J. Clin. Invest.* 1991;88:1901–5.

Iwatani N, Mabe H, Devriendt K, Kodama M, Miike T. Deletion of NKX2.1 gene encoding thyroid transcription factor-1 in two siblings with hypothyroidism and respiratory failure. *J. Pediatr.* 2000;137:272–6.

Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J.Clin.Invest.*2002;110 (10):1389-1398.

Kim PS, Arvan P. Calnexin and BiP act as sequential molecular chaperones during thyroglobulin folding in the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* 1995;128:29–38.

Kim PS, Hossain SA, Park YN, Lee I, Yoo SE, Arvan P. A single amino acid change in the acetylcholinesterase-like domain of thyroglobulin causes congenital goiter with hypothyroidism in the *cog/cog* mouse: A model of human endoplasmic reticulum storage diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95:9909–13.

Kim PS, Arvan P. Endocrinopathies in the Family of Endoplasmic Reticulum (ER) Storage Disease: Disorders of Protein Trafficking and the Role of ER Molecular Chaperones. *Endocr.Rev.* 1998; 19 (2):173-202.

Kim PS, Ding M, Menon S, Jung CG, Cheng J, Miyamoto T, Li B, Furudate S, Agui T. A missense mutation G2320R in the thyroglobulin gene causes non-goitrous congenital primary hypothyroidism in the WIC-rdw rat. *Mol. Endocrinol.* 2000;14:1944–53.

Kimura S, Kotani T, Mc Bride OW, Umeki K, Hirai K, Nakayama T, Ohtaki S. Human thyroid peroxidase: complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping, and identification of two alternately spliced mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987;84:5555–9.

Kimura S, Hong YS, Kotani T, Othaki S, Kikkawa F. Structure of the human thyroid peroxidase gene: comparison and relationship to the human myeloperoxidase gene. *Biochemistry* 1989;28:4481–9.

Kitanaka S, Takeda A, Sato U, Miki Y, Hishinuma A, Ieiri T, Igarashi T. A novel compound heterozygous mutation in the thyroglobulin gene resulting in congenital goitrous hypothyroidism with high serum triiodothyronine levels. *J. Hum. Genet.* 2006;51 (4):379–82.

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

Kopp P. Pendred syndrome and genetic defects in thyroid hormone synthesis. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2000;1:109–21.

Kopp P. Thyroid hormone synthesis: thyroid iodine metabolism. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. *Werner and Ingbar's The thyroid: a fundamental and clinical text.* 9th ed. Philadelphia: *Lippincott Williams and Wilkins*; 2005. p. 52-76.

Krude H, Schütz B, Biebermann H, von Moers A, Schnabel D, Neitzel H, Tönnies H, Weise D, Lafferty A, Schwarz S, DeFelice M, von Deimling A, van Landeghem F, DiLauro R, Grüters A. Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency. *J. Clin. Invest.* 2002;109:475–80.

Kuznetsov G, Chen LB, Nigam SK. Several endoplasmic reticulum stress proteins, including ERp72, interact with thyroglobulin during its maturation. *J. Biol. Chem.* 1994;269:22990–5.

Lamas L, Anderson PC, Fox JW, Dunn JT. Consensus sequences for early iodination and hormonogenesis in human thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* 1989;264:13541–5.

Libert F, Ruel J, Ludgate M, Swillens S, Alexander N, Vassart G, Dinsart C. Thyroperoxidase, an autoantigen with a mosaic structure made of nuclear and mitochondrial gene modules. *EMBO J* 1987; 6: (13) 4193–6.

Lindsay RS, Toft, AD. Hypothyroidism. *The Lancet*, v.349, p.413-417, 1997.

Macchia PE, Lapi P, Krude H, Pirro MT, Missero C, Chiovato L, Souabni A, Baserga M, Tassi V, Pinchera A, Fenzi G, Gruters A, Busslinger M, Di Lauro R. PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nat. Genet.* 1998;19:83–6.

Malthiery Y, Lissitzky S. Primary structure of human thyroglobulin deduced from the sequence of its 8448-base complementary DNA. *Eur. J. Biochem.* 1987;165:491–8

Marino M, Friedlander JA, McCluskey RT, Andrews D. Identification of a heparin-binding region of rat thyroglobulin involved in megalin binding. *J. Biol. Chem.* 1999;274:30377–86.

Marino M, Zheng G, Chiovato L, Pinchera A, Brown D, Andrews D, McCluskey RT. Role of megalin (gp330) in transcytosis of thyroglobulin by thyroid cells. A novel function in the control of thyroid hormone release. *J. Biol. Chem.* 2000;275:7125–37.

Marino M, Pinchera A, McCluskey RT, Chiovato L. Megalin in thyroid physiology and pathology. *Thyroid* 2001;11:47–56.

Mason ME, Dunn AD, Wortsman J, Day RN, Day KH, Hoback SJ, Myers HE, Shupnik MA, Dunn JT. Thyroids from siblings with Pendred's syndrome contain thyroglobulin messenger ribonucleic acid variants. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995;80:497–503.

Medeiros-Neto G, Targovnik HM, Vassart G. Defective thyroglobulin synthesis and secretion causing goiter and hypothyroidism. *Endocr. Rev.* 1993; 14:165–83.

Medeiros-Neto G, Kim PS, Yoo SE, Vono J, Targovnik HM, Camargo R, Hossain SA, Arvan P. Congenital hypothyroid goiter with deficient thyroglobulin. Identification of an endoplasmic reticulum storage disease with induction of molecular chaperones. *J. Clin. Invest.* 1996;98:2838–44.

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.

Meeus L, Gilbert B, Rydlewski C, Parma J, Roussie AL, Abramowicz M, Vilain C, Christophe D, Costagliola S, Vassart G. Characterization of a novel loss of function mutation of PAX8 in a familial case of congenital hypothyroidism with in-place, normal-sized thyroid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004 ;89:4285–91.

- Mendive FM, Rossetti LC, Vassart G, Targovnik HM. Identification of a new thyroglobulin variant: a guanine-to-arginine transition resulting in the substitution of arginine 2510 by glutamine. *Thyroid* 1997; 7:587–91.
- Mendive FM, Rivolta CM, Vassart G, Targovnik HM. Genomic organization of the 3' region of the human thyroglobulin gene. *Thyroid* 1999; 9:903–12.
- Mendive FM, Rivolta CM, Moya CM, Vassart G, Targovnik HM. Genomic organization of the human thyroglobulin gene. The complete intron–exon structure. *Eur. J. Endocrinol.* 2001; 145:485–96.
- Mendive FM, Rivolta CM, González-Sarmiento R, Medeiros-Neto G, Targovnik HM. Nonsense-associated alternative splicing of the human thyroglobulin gene. *Mol. Diagn.* 2005; 9:143–9.
- Mercken L, Simons MJ, Brocas H, Vassart G. Alternative splicing may be responsible for heterogeneity of thyroglobulin structure. *Biochimie* 1989; 71:223–6.
- Mestman JH. Diagnosis and management of maternal and fetal thyroid disorders. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 1999; 11: 289-302.
- Metzghrani H, Mziaut H, Courageot J, Oughideni R, Bastiani P, Miquelis R. Identification of the membrane receptor binding domain of thyroglobulin. Insights into quality control of thyroglobulin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:23340–6.
- Metzghrani A, Courageot J, Mani JC, Pugniere M, Bastiani P, Miquelis R. Protein-disulfide isomerase (PDI) in FRTL5 cells. PH-dependent thyroglobulin/PDI interactions determine a novel PDI function in the post- endoplasmic reticulum of thyrocytes. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:1920–9.
- Miki K, Harada T, Miyai K, Takai SI, Amino N. Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na⁺/I[–] symporter. *Nat. Genet.* 1997; 16:124–5.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cell. *Nuc. A. Res.* 1988; 16: 1215.
- Molina F, Pau B, Granier C. The Type 1 repeats of thyroglobulin regulate thyroglobulin degradation and T3, T4 release in thyrocytes. *FEBS Lett* 1996a; 391:229–31.
- Molina F, Bouanani M, Pau B, Granier C. Characterization of the Type 1 repeat from thyroglobulin, a cysteine-rich module found in proteins from different families. *Eur. J. Biochem.* 1996b; 240:125–33.

Moreno JC, Bikker H, Kempers MJE, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, Vulsma T, Ris-Stalpers C. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347:95–102.

Moya CM, Mendive FM, Rivolta CM, Vassart G, Targovnik HM. Genomic organization of the 5' region of the human thyroglobulin gene. *Eur. J. Endocrinol.* 2000; 143:789–98.

Moya CM, Varela V, Rivolta CM, Mendive FM, Targovnik HM. Identification and characterization of a novel large insertion/deletion polymorphism of 1464 base pair in the human thyroglobulin gene. *Thyroid* 2003; 13:319–23

Palumbo G, Gentile F, Condorelli GL, Salvatore G. The earliest site of iodination in thyroglobulin is residue number 5. *J. Biol. Chem.* 1990; 265:8887–92.

Park YN & Arvan P. The acetylcholinesterase homology region is essential for normal conformational maturation and secretion of thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:17085–9.

Parma J, Christophe D, Pohl V, Vassart G. Structural organization of the 5' region of the thyroglobulin gene. Evidence for intron loss and “exonization” during evolution. *J. Mol. Biol.* 1987; 196:769–79.

Pohlenz J, Medeiros-Neto G, Gross JL, Silveiro SP, Knobel M, Refetoff S. Hypothyroidism in a brazilian kindred due to iodide trapping defect caused by homozygous mutation in the sodium/iodide symporter gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 240:488–91.

Pohlenz J, Rosenthal IM, Weiss RE, Jhiang SM, Burant C, Refetoff S. Congenital hypothyroidism due to mutations in the sodium/iodide symporter. Identification of a nonsense mutation producing a downstream cryptic 3' splice site. *J. Clin. Invest.* 1998; 101:1028–35.

Pohlenz J, Dumitrescu A, Zundel D, Martine U, Schönberger W, Koo E, Weiss RE, Cohen RN, Kimura S, Refetoff S. Partial deficiency of thyroid transcription factor 1 produces predominantly neurological defects in humans and mice. *J. Clin. Invest.* 2002a; 109:469–73

Pohlenz J, Dumitrescu A, Aumann U, Koch G, Melchior R, Prawitt D, Refetoff S. Congenital secondary hypothyroidism caused by exon skipping due to a homozygous donor splice site mutation in the TSH β -subunit gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002b; 87:336–9.

Polak M, Le Gac I, Vuillard E, Guibourdenche J, Leger J, Toubert M, Madec A, Oury J, Czernichow P, Luton D. Fetal and neonatal thyroid function in relation to maternal Graves' disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 18:289–302

Porterfield, SP, Hendrich, CE The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development-current perspectives. *Endocr. Rev.* 1993; 14: 94-106.

PSIPRED (*Protein Structure Prediction*) Disponível em www.bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred.

Ricketts MH, Pohl V, de Martynoff G, Boyd CD, Bester AJ, Van Jaarsveld PP, Vassart G. Defective splicing of thyroglobulin gene transcripts in the congenital goitre of the Afrikanercattle. *EMBO J* 1985a; 4:731-7.

Ricketts MH, Schulz K, van Zyl A, Bester AJ, Boyd CD, Meinhold H, van Jaarsveld PP. Autosomal recessive inheritance of congenital goiter in Afrikaner cattle. *J. Hered.* 1985b; 76:12-6.

Ricketts MH, Simons MJ, Parma J, Mercken L, Dong Q, Vassart G. A nonsense mutation causes hereditary goitre in the Afrikaner cattle and unmasks alternative splicing of thyroglobulin transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84:3181-4.

Rivolta CM, Moya CM, Mendive FM, Targovnik HM. Genotyping and characterization of two polymorphic microsatellite markers located within introns 29 and 30 of the human thyroglobulin gene. *Thyroid* 2002; 12:773-9.

Rivolta CM, Esperante SA, Gruñeiro-Papendick L, Chiesa A, Moya CM, Domené S, Varela V, Targovnik HM. Five novel inactivating mutations in the human thyroid peroxidase gene responsible for congenital goiter and iodide organification defect. *Hum. Mutat.* 2003; 22:259.

Rivolta CM, MoyaCM, Gutnisky VJ, Varela V., Miralles-García JM, González-Sarmiento R, Targovnik HM. A new case of congenital goiter with hypothyroidism due to a homozygous p.R277X mutation in the exon 7 of the thyroglobulin gene: a mutational hot spot could explain the recurrence of this mutation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90:3766-70.

Rivolta CM, Targovnik HM. Molecular advances in thyroglobulin disorders. *Clin. Chim. Acta.* 2006; 374(1-2):8-24.

Rodriguez AM, Perron B, Lacroix L, Caillou B, Leblanc G, Schlumberger M, Bidart JM, Pourcher T. Identification and characterization of a putative human iodine transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87:3500-3.

Sheffield VC, Kraiem Z, Beck JC, Nishimura D, Stone EM, Salameh M, Sadeh O, Glaser B. Pendre syndrome maps to chromosome 7q21-34 and is caused by a intrinsic defect in thyroid iodine organification. *Nat. Genet.* 1996; 12:424-6

Sterk A, van Dijk JE, Veenboer GJ, Moorman AF, de Vijlder JJ. Normal-sized thyroglobulin messenger ribonucleic acid in Dutch goats with a thyroglobulin

synthesis defect is translated into a 35,000 molecular weight N-terminal fragment. *Endocrinology* 1989; 124: 477–83.

Sunthornthepvarakul T, Gottschalk ME, Hayashi Y, Refetoff S. Resistance to thyrotropin caused by mutations in the thyrotropin-receptor gene. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332:155–60.

Suzuki K, Lavaroni S, Mori A, Ohta M, Saito J, Pietrarelli M, Singer DS, Kimura S, Katoh R, Kawaoi A, Kohn LD. Autoregulation of thyroid-specific gene transcription by thyroglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95:8251–6.

Suzuki K, Mori A, Lavaroni S, Miyagi E, Ulianich L, Katoh R, Kawaoi A, Kohn LD. In vivo expression of thyroid transcription factor-1 RNA and its relation to thyroid function and follicular heterogeneity: identification of follicular thyroglobulin as a feedback suppressor of thyroid transcription factor-1 RNA levels and thyroglobulin synthesis. *Thyroid* 1999a; 9:319–31.

Suzuki K, Lavaroni S, Mori A, Yamamoto K, Yi X, Miyagi E, Katoh R, Kohn LD, Kawaoi A. Thyroglobulin: a master regulator of follicular function via transcriptional suppression of thyroid specific genes. *Acta Histochemistry cytochemistry*.1999b; 32: 111-119

Suzuki K, Mori A, Saito J, Moriyama E, Ullianich L, Kohn LD. Follicular thyroglobulin suppresses iodine uptake by suppressing expression of the sodium/iodine symporter gene. *Endocrinology*.1999c; 140:5422-5430.

Suzuki K & Kohn LD. Differential regulation of apical and basal iodine transporters in the thyroid by thyroglobulin. *J. Endocrinol.*2006; 189:247-255

Swillens S, Ludgate M, Mercken L, Dumont JE, Vassart G. Analysis and structure homologies between thyroglobulin and acetylcholinesterase: possible functional and clinical significance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986; 137:142–8.

Targovnik H, Propato F, Varela V, Wajchenberg B, Knobel M, D'Abronzio HF, Medeiros-Neto G. Low levels of thyroglobulin messenger ribonucleic acid in congenital goitrous hypothyroidism with defective thyroglobulin synthesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1989; 69:1137–47.

Targovnik HM, Varela V, Juvenal GJ, Propato F, Chester HA, Krawiec L, Frechtel G, Moran DH, Perinetti HA, Pisarev MA. Differential levels of thyroid peroxidase and thyroglobulin messenger ribonucleic acids in congenital goiter with defective thyroglobulin synthesis. *J. Endocrinol. Invest.* 1990; 13:797–806.

Targovnik HM, Cochaux P, Corach D, Vassart G. Identification of a minor Tg mRNA transcript in RNA from normal and goitrous thyroids. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1992; 84:R23–6.

Targovnik HM, Medeiros-Neto G, Varela V, Cochaux P, Wajchenberg BL, Vassart G. A nonsense mutation causes human hereditary congenital goiter with preferential production of a 171-nucleotide-deleted thyroglobulin ribonucleic acid messenger. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993; 77:210–5.

Targovnik H, Vono J, Billerbeck AEC, Cerrone GE, Varela V, Mendive F, Wajchenberg BL, Medeiros-Neto G. A 138-nucleotide deletion in the thyroglobulin ribonucleic acid messenger in a congenital goiter with defective thyroglobulin synthesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995; 80:3356–60.

Targovnik HM, Frechtel GD, Mendive FM, Vono J, Cochaux P, Vassart G, Medeiros-Neto G. Evidence for the segregation of three different mutated alleles of the thyroglobulin gene in a family with congenital goiter and hypothyroidism. *Thyroid* 1998; 8:291–7.

Targovnik HM, Rivolta CM, Mendive FM, Moya CM, Medeiros-Neto G. Congenital goiter with hypothyroidism caused by a 5' Splice Site mutation in the thyroglobulin gene. *Thyroid* 2001; 11:685–90.

Taurog A. Hormone synthesis. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. *Werner and Ingbar's The thyroid: a fundamental and clinical text*. 8th ed. Philadelphia: *Lippincott Williams and Wilkins*; 2000. p. 61-85.

Tassi VPN, Di Lauro R, Van Jaarsveld P, Alvino CG. Two abnormal thyroglobulin like polypeptides are produced from Afrikaner cattle congenital goitre mRNA. *J. Biol. Chem.* 1984; 259:10507–10.

Tomer Y, Greenberg DA, Concepcion E, Ban Y, Davies TF. Thyroglobulin is a thyroid specific gene for the familial autoimmune thyroid diseases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87:404–7.

Tonacchera M, Agretti P, Pinchera A, Rosellini V, Perri A, Collecchi P, Vitti P, Chiovato L. Congenital hypothyroidism with impaired thyroid response to thyrotropin (TSH) and absent circulating thyroglobulin: evidence for a new inactivating mutation of the TSH receptor gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000; 85:1001–8.

Ulianich L, Suzuki K, Mori A, Nakazato M, Pietrarelli M, Goldsmith P, Pacifico F, Consiglio E, Formisano S, Kohn LD. Follicular thyroglobulin (TG) suppression of thyroid-restricted genes involves the apical membrane asialoglycoprotein receptor and TG phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:25099–107.

van de Graaf SAR, Pauws E, de Vjilder JJM, Ris-Stalpers C. The revised 8307 base pair coding sequence of human thyroglobulin transiently expressed in eukaryotic cells. *Eur. J. Endocrinol.* 1997; 136:508–15.

- van de Graaf SAR, Cammenga M, Ponne NJ, Veenboer GJ, Gons MH, Orgiazzi J, de Vijlder JJ, Ris-Stalpers C. The screening for mutations in the thyroglobulin cDNA from six patients with congenital hypothyroidism. *Biochimie* 1999a; 81:425–32.
- van de Graaf SAR, Ris-Stalpers C, Veenboer GJM, Cammenga M, Santos C, Targovnik HM, de Vijlder JJ, Medeiros-Neto G. A premature stopcodon in thyroglobulin mRNA results in familial goiter and moderate hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999b; 84:2537–42.
- van de Graaf SAR, Ris-Stalpers C, Pauws E, Mendive FM, Targovnik HM, de Vijlder JJM. Up to date with human thyroglobulin. *J. Endocrinol.* 2001; 170:307–21.
- Van Herle AJ, Vassart G, Dumont JE. Control of thyroglobulin synthesis and secretion. *N. Engl. J. Med.* 1979; 301:293-41 and 307-14.
- van Ommen GJB, Sterk A, Merken LOY, Arnberg AC, Baas F, de Vijlder JJM. Studies on the structures of the normal and abnormal goat thyroglobulin genes. *Biochimie* 1989; 71:211–21.
- Varela V, Rivolta CM, Esperante SA, Gruñeiro-Papendieck G, Chiesa A, Targovnik HM. Three mutations (p.Q36H, p.G418fsX482, and g.IVS19-2A>C) in the dual oxidase 2 gene responsible for congenital goiter and iodide organification defect. *Clin. Chem.* 2006; 52:182-91.
- Veenboer GJM, de Vijlder JJM. Molecular basis of the thyroglobulin synthesis defect in Dutch goats. *Endocrinology* 1993; 132:377–81.
- Vigone MC, Fugazzola L, Zamproni I, Passoni A, Di Candia S, Chiumello G, Persani L, Weber G. Persistent mild hypothyroidism associated with novel sequence variants of the DUOX2 gene in two siblings. *Hum. Mutat.* 2005; 26:395.
- Vilain C, Rydlewski C, Duprez L, Heinrichs C, Abramowicz M, Malvaux P, Renneboog B, Parma J, Costagliola S, Vassart G. Autosomal dominant transmission of congenital thyroid hypoplasia due to loss-of-function mutation of PAX8. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86:234–8.
- Vono-Toniolo J, Rivolta CM, Targovnik HM, Medeiros-Neto G, Kopp P. Naturally occurring mutations in the thyroglobulin gene. *Thyroid.* 2005; 15(9):1021-33.
- Wang D, De Deken X, Milenkovic M, Song Y, Pirson I, Dumont JE, Miot F. Identification of a novel partner of Duox: EFP1, a thioredoxin-related protein. *J. Biol. Chem.* 2005; 280:3096-103.
- Zheng G, Marino M, Zhao J, McCluskey RT. Megalin (gp330): a putative endocytic receptor for thyroglobulin. *Endocrinology* 1998; 139:1462–5.