Cristine Barboza Beltrão

Contribuição da dosagem de tireoglobulina e de exames de imagem para o diagnóstico de hipotireoidismo congênito: pesquisa dos genes *PAX8* e receptor do TSH na disgenesia tireoidiana.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Endocrinologia

Orientadora: Dra Suemi Marui

São Paulo

2009

Cristine Barboza Beltrão

Contribuição da dosagem de tireoglobulina e de exames de imagem para o diagnóstico de hipotireoidismo congênito: pesquisa dos genes *PAX8* e receptor do TSH na disgenesia tireoidiana.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Endocrinologia

Orientadora: Dra Suemi Marui

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Beltrão, Cristine Barboza
Contribuição da dosagem de tireoglobulina e de exames de imagem para o diagnóstico de hipotireoidismo congênito : pesquisa dos genes *PAX8* e receptor do TSH na disgenesia tireoidiana / Cristine Barboza Beltrão. -- São Paulo, 2009.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Clínica Médica.
Área de concentração: Endocrinologia.
Orientadora: Suemi Marui.

Descritores: 1.Hipotireodismo congênito 2.Tireoglobulina 3.Ultrassom 4.Cintilografia 5.Disgenesia da tireóide

USP/FM/SBD-210/09

Aos meus pais, Carlos e Célia, que me apoiaram e apóiam em todos os momentos de minha vida

Ao Erick, companheiro dos momentos de diversão e trabalho

Aos meus irmãos, Carlinhos e Cristiano, pelo carinho mútuo e superação diária

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos que passaram por mim durante a trajetória desta dissertação. Foi bastante prazeroso conhecer tanta gente diferente e poder fazer novas amizades. Afinal, sempre fica alguma coisa de alguém que passa por nós... Espero ter deixado um pouquinho de mim e, com certeza, levarei um pouquinho de cada um que conheci.

Agradeço a Deus por me permitir iniciar, continuar e, finalmente, concluir esta dissertação.

Agradeço aos meus pequenos pacientes, sem os quais todo esse trabalho não seria possível.

Agradeço à Dra. Suemi, amiga, orientadora, pessoa exemplar, correta que me acolheu de braços abertos no laboratório. Por estar sempre presente, desde o surgimento da idéia desse trabalho até sua conclusão. Por compartilhar sua experiência profissional, “alfabetizar-me” nos conhecimentos da biologia molecular e, principalmente, preocupar-se também com o bem-estar pessoal de seus alunos, onde me incluo. Considero-a um grande exemplo e sinto-me honrada e feliz de ser sua aluna.

À Prof. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça, por ter me acolhido no Departamento de Endocrinologia.

Ao Dr. Meyer Knobel, por ter me acolhido na Unidade de Tireóide.

À Dra. Camila Gomes, amiga e colega de trabalho, quem me apresentou aos princípios da Pesquisa.

Às Dras. Maria Cristina Chammas e Adriana Gonçalves Juliano pela realização dos exames ultrassonográficos e valiosa discussão dos mesmos.

Aos Drs. MarceloTatit Sapienza e Tomoco Watanabe pelas úteis discussões e realização de exames na Medicina Nuclear.

Aos Drs. Italo Medeiros e Tanit Sanchez pela avaliação dos pacientes com suspeita de alteração neurossensorial.

À Emilia Modolo Pinto, Ana Elisa Correa Billeberck, Mirian Nishi pela ajuda na bancada.

À Ester Saraiva Brust, pessoa essencial para a conclusão do estudo molecular.

À Maria Silvia Cardia e Jacira Lima pela ajuda na extração de DNA dos pacientes.

A todos que fazem parte do LIM 25 e LIM 42.

Aos funcionários da APAE – São Caetano, em especial a Silvia Salgado, Sandra Galleazo, Maurize Perin, Camila Gonçalves, Maria Celina Lopes, Katia Cavalsan, Letícia Zondona.

Aos Drs. Ivo J.P. Arnhold, Alexander Jorge e Durval Damiani pelas valiosas sugestões durante a banca de qualificação.

A Ivoneide, Patrícia e meus sogros e amigos pelo carinho, ajuda e torcida.

“Se você encontrar um caminho sem obstáculos, ele provavelmente não leva a lugar nenhum."

(Frank Clark)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

Referências: adaptado de International Commitee 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 Julia 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 dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS..... ix
LISTA DE TABELAS..... xi
RESUMO..... xii
ABSTRACT..... xiv

1 INTRODUÇÃO..... 1

1.1 DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA TIREÓIDE 1

1.2 ETIOLOGIA DO HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO..... 3

1.3 QUADRO CLÍNICO..... 13

1.4 DIAGNÓSTICO 13

2 OBJETIVOS..... 21

3 MÉTODOS..... 22

3.1 ESTABELECIMENTO DO DIAGNÓSTICO..... 25

3.2 ESTUDO MOLECULAR..... 28

4 RESULTADOS..... 31

5 DISCUSSÃO..... 49

6 CONCLUSÕES..... 61

7 ANEXOS..... 62

8 REFERÊNCIAS..... 80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão frontal da migração da tireóide (setas) em relação a outras estruturas da cabeça e pescoço..... 2

Figura 2 - Célula folicular tireóidea mostrando as etapas chaves de transporte de iodo, síntese de hormônios tireoidianos e a localização do defeito na disormonogênese..... 8

Figura 3 - Fluxograma para diagnóstico dos pacientes com hipotireoidismo congênito..... 24

Figura 4 - Gráfico de comparação entre os níveis de TSH neonatal confirmatório e TSH ao diagnóstico (após 3 anos)..... 34

Figura 5 - Distribuição percentual do diagnóstico etiológico usando a ultrassonografia com Doppler colorido nos pacientes estudados (número de casos e percentual).....35

Figura 6 - Ultrassonografia de paciente com hipotireoidismo congênito mostrando glândula tireoidiana de localização e tamanho normal (A) e exame com Doppler colorido demonstrando vascularização difusa da glândula normal e das artérias carótidas (B)..... 36

Figura 7 - Ultrassonografia da região cervical mostrando tecido glandular em região submandibular (A) e presença de vascularização deste tecido ao Doppler colorido (B), denotando tecido tireoidiano ectópico..... 37

Figura 8 - Ultrassonografia da região cervical mostrando tecido tímico com parênquima mais heterogêneo em comparação com tecido tireoidiano normal..... 38

Figura 9 - Ultrassonografia da região tireoidiana, identificando tecido ganglionar (seta), por apresentar textura mais homogênea e tecido hipoecogênico em comparação com tecido tireoidiano normal..... 38

Figura 10 - Distribuição do diagnóstico etiológico dos 40 pacientes estudados através da cintilografia de tireóide (casos e percentual).....39

Figura 11 - Cintilografia da tireóide em crianças com hipotireoidismo congênito. (A) As imagens mostram ausência de captação em qualquer região cervical indicando atireose; (B) glândula aumentada de tamanho; (C) glândula ectópica sublingual (seta).....41

Figura 12 - Gráficos de percentual de queda da captação de iodo após administração de perclorato de sódio intravenoso ao longo do tempo. Teste positivo (painel A) e negativo ou normal (painel B).....42

Figura 13 - Níveis de tireoglobulina (média, desvio-padrão e variação) de acordo com o diagnóstico cintilográfico nos pacientes estudados.....46

Figura 14 - Distribuição do diagnóstico etiológico de 40 pacientes com hipotireoidismo congênito após determinação de tireoglobulina, USDC colorido, cintilografia e teste do perclorato (número de casos e percentual).....47

Figura 15 - Eletroesferograma de parte do exon 10 do gene *TSHR*. A seta indica a localização da troca em homozigose de G>C, indicando o polimorfismo Glu727Asp.....48

Figura 16 - Fluxograma de diagnóstico para hipotireoidismo congênito..... 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos defeitos encontrados na disgenesia e disormonogênese tireoidianas..... 20

Tabela 2 - Valores hormonais e de tireoglobulina nos pacientes estudados.. 33

Tabela 3 - Número de pacientes e resultado à cintilografia e captação da tireóide..... 40

Tabela 4 - Resultados de ultrassonografia, cintilografia da tiróide e teste do perclorato intravenoso..... 43

Tabela 5 - Diagnóstico discrepante encontrado entre os métodos de ultrassonografia com Doppler colorido e cintilografia da tireóide..... 44

Tabela 6 - Comparação dos diagnósticos dados pela ultrassonografia com Doppler colorido e cintilografia..... 45

RESUMO

Beltrão, CB. *Contribuição da dosagem de tireoglobulina e exames de imagem para o diagnóstico de hipotireoidismo congênito: pesquisa dos genes PAX8 e receptor do TSH na disgenesia tireoidiana* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 92 p.

INTRODUÇÃO: O hipotireoidismo congênito (HC) é uma doença, de acometimento neonatal, caracterizada por diminuição nos níveis de hormônios tireoidianos. As causas mais comuns de HC primário permanente são as alterações no desenvolvimento da glândula tireóide (disgenesia) e os defeitos de síntese dos hormônios tireóideos (disormonogênese). A determinação da etiologia do HC tem papel importante na determinação da gravidade da doença, evolução e tratamento. Essa investigação é feita através de exames como ultrassonografia e cintilografia (CINT) da tireóide. Além disso, com o conhecimento do genoma humano, diversas mutações foram descritas, sendo a investigação molecular importante para a determinação da etiologia da doença. **OBJETIVOS:** 1. Determinar o diagnóstico etiológico dos pacientes com HC a partir de dosagens hormonais, tireoglobulina e exames de imagem; 2. Estabelecer a importância do uso da ultrassonografia com Doppler colorido (USDC) no diagnóstico etiológico; 3. Estabelecer a importância do uso do teste do perclorato de sódio intravenoso (PSIV) no diagnóstico diferencial de HC por disormonogênese; 4. Estudar os genes *PAX8* e receptor do TSH (*TSHR*) em pacientes com HC causado por disgenesia tireoidiana **MÉTODOS:** Avaliamos 40 pacientes acompanhados na APAE - São Caetano com diagnóstico de HC primário e permanente acima de 3 anos de idade. Os pacientes realizaram dosagens de T3, T4, T4 livre, TSH, tireoglobulina (TG) e anticorpo anti-TG pelo método imunofluorimétrico, além de USDC e CINT. Os pacientes com suspeita de disormonogênese foram submetidos ao teste PSIV e avaliação com otorrinolaringologista e audiometria tonal, se necessário. Os pacientes que apresentavam disgenesia tireoidiana tiveram o DNA extraído a partir de leucócitos periféricos para o estudo dos genes *PAX8* e *TSHR* através de PCR e sequenciamento automático. **RESULTADOS:** Avaliamos 28 pacientes do sexo feminino e 12 do sexo masculino, após suspensão do tratamento com levotiroxina por 4 semanas. A idade média foi de 6,5 anos. O TSH médio foi 129,9 µUI/mL (normal: 0,7-6,0). Os valores de T3, T4 e T4 livre variaram de 14 – 217 ng/dL (normal: 105-269), <1,6 – 15,8 µg/dL (normal: 1,5-15) e < 0,3 – 2,7 ng/dL (normal: 0,7-1,5), respectivamente. A TG variou de <1 – 287 ng/dL (normal: 1,7-35). A USDC mostrou 21 pacientes com tireóide tópica (53%), 8 pacientes com tireóide ectópica (20%) e 11 pacientes com atireose (27%). Na CINT, o mapeamento identificou tireóide tópica em 20 pacientes (51%), tireóide ectópica em 13 pacientes (32%), e atireose em 7 pacientes (17%). A captação

mostrou-se aumentada em 2 horas em 10 pacientes. O teste PSIV foi realizado em 9 pacientes com bócio ou glândula de tamanho normal ao USDC, cuja captação foi aumentada. Apenas um paciente apresentou vômito ao início do teste. Seis pacientes apresentaram teste positivo, considerando uma queda maior que 20%. Nenhum desses pacientes apresentava surdez neurossensorial. Encontramos discrepância entre USDC e CINT em 9 pacientes, principalmente nos casos de ectopia. A dosagem de TG auxiliou na confirmação de atireose. Os níveis mais altos de TG encontrados foram nos casos de disormonogênese causados por defeito na organificação. Assim, determinamos o diagnóstico de ectopia em 32,5% dos pacientes, hipoplasia em 20%, defeito na organificação (defeito de TPO ou THOX2) em 17,5%, atireose em 15%, defeito na TG em 7,5% e 3 casos a esclarecer (7,5%). Vinte e sete pacientes foram diagnosticados como portadores de disgenesia tireoidiana e não apresentaram mutações nos genes *PAX8* e *TSHR*. **CONCLUSÃO:** Estabelecemos o diagnóstico etiológico em 37 dos 40 pacientes estudados. A USDC mostrou-se importante no diagnóstico etiológico do HC, especialmente associada à dosagem de TG. O teste PSIV mostrou-se seguro no diagnóstico diferencial do HC por disormonogênese. Não identificamos nenhuma mutação nos genes *PAX8* e *TSHR* nos casos estudados de disgenesia.

Descritores: 1.Hipotireoidismo congênito. 2.Tireoglobulina. 3.Ultrassom.

4.Cintilografia. 5.Disgenesia tireoidiana.

ABSTRACT

Beltrão, CB. *Contribution of thyroglobulin and image exams for congenital hypothyroidism diagnosis: research of PAX8 and TSH receptor gene in dysgenesis* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 92 p.

INTRODUCTION: Congenital hypothyroidism (CH) is a disease at neonatal period characterized by low thyroid hormones levels. Most common causes of primary CH are alterations at thyroid gland development (dysgenesis) and thyroid hormone synthesis defects (dyshormonogenesis). The establishment of CH etiology has important role to define the severity, evolution and treatment of the disease. This investigation is based on thyroid ultrasound and radiouptake and radionuclide imaging (RAIU). With human genome knowledge, several mutations were described, becoming molecular investigation so important to etiology definition. **OBJECTIVES: 1.** Establish the etiologic diagnosis of CH patients using hormonal measurements, thyroglobulin and imaging exams. **2.** Establish the importance of color Doppler ultrasound (CDUS) in etiologic diagnosis. **3.** Establish the importance of intravenous perchlorate sodium test in differential diagnosis of CH due to dyshormonogenesis. **4.** Study *PAX8* and TSH receptor *(TSHR)* genes in patients with CH due to thyroid dysgenesis. **METHODS:** We evaluated forty patients followed-up at APAE - São Caetano with primary and permanent CH diagnosis above 3 years-old. Patients performed T3, T4, free T4, TSH, thyroglobulin (TG) and anti-TG antibody using immunofluorimetric assays, besides thyroid CDUS and RAIU. Patients with thyroid dysgenesis had their DNA extracted from peripheral leukocytes to study *PAX8* and *TSHR* genes using PCR and automatic sequencing. Patients with dyshormonogenesis suspected were submitted to intravenous perchlorate sodium test and otorhinolaryngologist and tonal audiometric evaluation, if necessary. **RESULTS:** We evaluated 28 female and 12 male after levothyroxine treatment off for 4 weeks. Mean age of studied patients was 6.5 years-old. Mean TSH was 129.9 µUI/mL (normal: 0.7-6.0). T3, T4 and freeT4 ranged from 14 – 217 ng/dL (normal 105-269) , <1.6 – 15.8 µg/dL (normal: 1.5-15) and < 0.3 – 2.7 ng/dL (normal: 0.7-1.5) respectively. TG level ranged from < 1 – 287 ng/dL (normal 1.7-35). CDUS showed normally located thyroid in 21 patients (53%), ectopy in 8 patients (20%), and athyrosis in 11 patients (27%). At RAIU, thyroid scan identified normal located gland in 20 patients (51%), ectopy in 13 patients (32%) e athyrosis in 7 patients (17%). Two-hours uptake was elevated in ten patients. Intravenous perchlorate sodium test was performed in 9 patients with goiter or normal volume at CDUS, with normal or elevated uptake. Only one patient presented vomit. Six patients had positive test, considering more than 20% of decline. None from these patients had neurosensorial deafness. We found discrepancy between CDUS and RAIU in 9

patients, especially in ectopic cases. Thyroglobulin measurement helped to confirm athyrosis. Highest TG levels were found in dyshormonogenesis patients due to organification defects. Therefore we determined etiologic diagnosis of ectopic gland in 32,5% of patients, hypoplasia in 20%, organification defect (*TPO* or *THOX2* defects) in 17,5%, athyrosis in 15%, thyroglobulin defect in 7,5% and three cases were undefined (7,5%). Twenty seven patients were diagnosed with thyroid dysgenesis and had no mutation in *PAX8* and *TSHR* genes. **CONCLUSION:** We established the etiologic diagnosis in 37 from 40 patients here studied. CDUS was useful on etiologic diagnosis of CH, especially associated to thyroglobulin level. Intravenous perchlorate sodium test was safe and efficient in CH differential diagnosis of dyshormonogenesis. We identified no mutation in *PAX8* and *TSHR* genes in dysgenesis cases.

Descriptors: 1.Congenital hypothyroidism. 2.Thyroglobulin. 3.Ultrasonics.

4.Radionuclide imaging. 5.Thyroid dysgenesis.

1 INTRODUÇÃO

O hipotireoidismo congênito (HC) pode ser definido como um distúrbio metabólico sistêmico caracterizado pela produção insuficiente de hormônios tireoidianos (T3 e T4) durante o período neonatal [1].

Ocorre em cerca de 1:3.000 a 1:4.000 recém-nascidos, sendo uma causa de retardo mental que pode ser prevenida quando diagnosticada e tratada precocemente [2]. O programa de rastreamento, baseado no “teste do pezinho”, tornou-se obrigatório em todo o Brasil desde 1983, permitindo o diagnóstico precoce de HC. Este programa trouxe novas informações sobre epidemiologia, fisiopatologia, diagnóstico e tratamento das doenças tireoidianas da infância. O diagnóstico molecular também trouxe e trará benefícios, não só sobre o conhecimento dos genes envolvidos no HC, assim como para os pacientes e seus familiares, que poderão ser tratados e aconselhados sobre os riscos de forma mais adequada.

1.1 DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA TIREÓIDE

A glândula tireóide é a primeira estrutura endócrina que se desenvolve no embrião humano, vinte e dois dias após a concepção, a partir da invaginação e espessamento do assoalho da faringe primitiva. A partir daí, migra em direção caudal até a base do pescoço enquanto continua a proliferar. Aos 24-32 dias, a tireóide já é uma estrutura bilobar, que alcança a posição final aos 40-50 dias. Aos 51 dias, a glândula mostra sua forma definitiva [3] (Figura 1).

A tireóide contém dois tipos de células produtoras de hormônios que têm origem embriológica distinta. As células C ou parafoliculares produtoras de calcitonina derivam do neuroectoderma e compreendem 1% das células da tireóide humana. As células foliculares produtoras de tiroxina encontram-se em maior quantidade e derivam do endoderma. Estas células formam uma estrutura denominada folículo, onde se acumula o colóide e onde ocorre a iodinação da tireoglobulina [3].

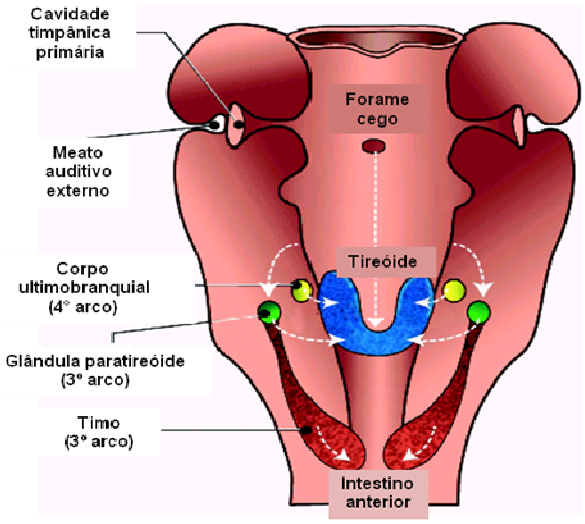


Figura 1: Visão frontal da migração da tireóide (setas) em relação a outras estruturas da cabeça e pescoço. Modificado a partir de Van Vliet, 2003 [3]

Mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da tireóide

A transcrição de genes específicos da tireóide, que codificam proteínas expressas nesta glândula, é regulada por fatores de transcrição como TTF1 (fator de transcrição da tireóide 1), FOXE1 ou TTF2 (fator de transcrição da tireóide 2), PAX8 (“paired box gene 8”), HHEX (“haematopoietically expressed homeobox”) e outros.

O TTF1 regula a transcrição dos genes da tireoglobulina (TG), tireoperoxidase (TPO) e receptor do TSH (TSHR) nas células foliculares da tireóide. O PAX8 atua na diferenciação celular e na manutenção do estado diferenciado, além de ser essencial para a proliferação celular tireoidiana. A função do PAX8 e do TTF1 é semelhante, porque ambos são essenciais nos últimos passos do desenvolvimento da tireóide. FOXE1 promove a migração das células foliculares tireoidianas. HHEX é um marcador precoce das células tireoidianas e seu papel seria manter a expressão de TTF1 e PAX8 na organogênese tireoidiana [4].

1.2 ETIOLOGIA DO HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO

O hipotireoidismo pode ser transitório ou permanente [5].

O hipotireoidismo transitório é diagnosticado pela história clínica materna de uso de medicamentos ou pela passagem de anticorpos na doença autoimune. Recém-nascidos prematuros também podem apresentar

hipotireoidismo transitório por imaturidade do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide [5].

O hipotireoidismo permanente ou definitivo pode ser classificado em primário (acometendo a glândula tireóide), secundário ou central (acometendo o eixo hipotálamo-hipofisário) e em resistência aos hormônios tireóideos. Em cerca de 85% dos casos o hipotireoidismo congênito (HC) ocorre de forma esporádica. No restante, a etiologia é genética [6].

Causas de hipotireoidismo congênito definitivo

1.2.1 Carência de iodo

Com a obrigatoriedade do sal iodado no Brasil, atualmente o HC causado por carência de iodo é raramente visto na sua apresentação como cretinismo endêmico no Estado de São Paulo. Em recente estudo realizado neste Estado, foi encontrada iodúria aumentada, indicativa de excesso de ingestão de iodo em crianças com idade escolar [7].

1.2.2 Disgenesia tireóidea

Os defeitos no desenvolvimento da tireóide são responsáveis por 60-70% das causas de HC em áreas onde não há carência de iodo. Frequentemente, são casos esporádicos, sendo mais comuns em meninas, hispânicos, pacientes com síndrome de Down, portadores de doenças cardíacas congênitas e luxação congênita do quadril [8]. A disgenesia compreende (1) ausência completa da tireóide (atireose); (2) ausência parcial da tireóide (hemiagenesia); (3) hipoplasia da glândula e (4) defeito na

migração das células tireóideas durante o período embriológico (ectopia) [4]. Como os fatores de transcrição TTF1, TTF2 e PAX8 estão presentes desde o início da formação embrionária da tireóide, mutações parecem estar envolvidas, porém em raros casos de disgenesia, provavelmente pela incompatibilidade com a vida por acometer também órgãos vitais [1,9].

1.2.2a “THYROID TRANSCRIPTION FACTOR 1” (TTF1)

O TTF1 expressa-se nos tecidos cerebrais, hipófise anterior e pulmões [10]. Ele ativa a transcrição gênica da tireoglobulina (TG) e tireoperoxidase (TPO), além da proteína surfactante humana nos pulmões. O gene localiza-se no cromossomo 14 q13 e possui 3 exons [11]. Os casos com mutação descrita apresentam HC grave, associado à insuficiência respiratória e coreoatetose [12]. A herança é autossômica dominante. A tireóide é tópica e o volume tireoidiano encontra-se diminuído ou normal [4, 13-15].

1.2.2b “THYROID TRANSCRIPTION FACTOR 2” (Forkhead Box E1, FOXE1, TTF2)

É um fator de transcrição que se expressa na tireóide, na maior parte do endoderma do intestino anterior, no ectoderma craniofaríngeo e na bolsa de Rathke [16]. O gene está localizado no cromossomo 9 q22 e possui um único exon [17]. Os pacientes com mutação apresentam fenda palatina, cabelos eriçados e atresia coanal [17, 18]. A herança é autossômica recessiva. A glândula tireoidiana apresenta-se diminuída de tamanho [4].

1.2.2c “PAIRED BOX GENE 8” (PAX8)

O PAX8 é um membro da família de proteínas PAX e exerce importante papel no desenvolvimento da célula tireoidiana. É expresso na tireóide como fator de transcrição dos genes TG, TPO e NIS [19]. O gene está localizado no cromossomo 2 q12-14 e possui 11 exons [11].

Mutações do *PAX8* foram identificadas em pacientes com disgenesia tireóidea esporádica, variando de glândula hipoplásica em posição normal a ectópica [20]. Hemiagenesia renal foi relatada em dois casos afetados, sendo um deles com hipercalciúria [20]. Em humanos, as mutações descritas compreendem R31H, R31C, Q40P, S48F, R52P, S54G, C57Y, L62R, R108X e delACCC no exon 7 [19, 21]. A herança encontrada é autossômica dominante [4].

1.2.2d RESISTÊNCIA AO TSH

O TSH estimula a captação do iodo pelo tireotrofo, a formação da TG e a ação da TPO após sua ligação ao receptor de membrana. A resistência ao TSH pode ser causada por mutação no receptor de TSH (TSHR) ou na proteína G (“Gsα-gene stimulatory guanine nucleotide-binding protein”).

A incidência de mutações no gene do *TSHR* em pacientes com HC é desconhecida, porém parece ser rara (0,01%) [22]. O gene que codifica o *TSHR* está localizado no cromossomo 14 q31 e possui 10 exons [11]. Os pacientes que apresentam mutação no *TSHR* podem apresentar graus variados de hipotireoidismo, de acordo com a gravidade da mutação.

Pacientes com esse defeito apresentam TSH elevado, com níveis baixos ou limítrofes de T4. A glândula tireóide, em geral, apresenta-se de tamanho normal ou hipoplásico [23]. A cintilografia geralmente apresenta captação normal ou baixa de iodo [24, 25]. A herança é autossômica recessiva. Mutações inativadoras têm sido descritas em casos com hipotireoidismo e hipoplasia [26].

Raramente a resistência ao TSH deve-se a uma mutação inativadora da proteína G, causando também pseudo-hipoparatireoidismo tipo IA ou osteodistrofia hereditária de Albright [25,27].

1.2.3 Disormonogênese

Os erros inatos da formação dos hormônios tireoidianos correspondem a 10-15% dos casos de HC, acometendo 1:30.000 nascidos vivos. Esta prevalência pode ser maior em populações geneticamente aparentadas entre si, com elevado grau de consanguinidade [28, 29].

As doenças são hereditárias e com herança autossômica recessiva [16]. Os defeitos podem ser classificados da seguinte maneira: (a) incapacidade de concentrar iodo, (b) defeito na organificação do iodo por alteração da enzima peroxidase (TPO) ou do sistema H_2O_2, (c) defeito na síntese e transporte da TG, (d) atividade diminuída da iodotirosina desalogenase. A associação de defeito na organificação com surdez neurossensorial é conhecida como síndrome de Pendred.

Atualmente, o diagnóstico é confirmado após a detecção de mutação nos seguintes genes conhecidos: (a) sódio-iodo simportador (*NIS*), (b)

pendrina (*PDS* ou *SLC26A4*), tireoperoxidase (*TPO*) e *THOX2*, (c) tireoglobulina (*TG*) e (d) iodotirosina desalogenase (*DEHAL1*).

Nos casos de disormonogênese, a síntese dos hormônios pode estar comprometida em qualquer uma de suas passagens (Figura 2).

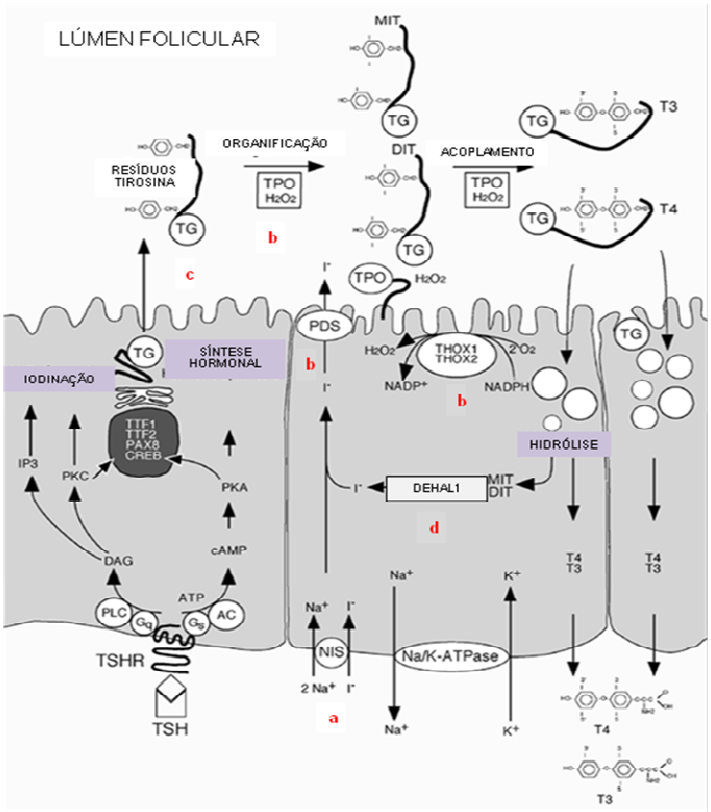


Figura 2: Célula folicular tireóidea mostrando as etapas chaves de transporte de iodo, síntese de hormônios tireoidianos e a localização do defeito na disormonogênese. **a.** defeito de *NIS* **b.** defeito de *TPO*, *PDS* e *THOX2*; **c.** defeito de *TG*; **d.** defeito de *DEHAL1*. AMP, monofosfato de adenosina; cAMP, AMP cíclico; DIT, diiodotirosina; MIT, monoiodotirosina; NIS, sódio-iodo simportador; T3, triiodotironina; T4, tiroxina; TG, tireoglobulina; TPO, tireoperoxidase; TSH, tireotrofina; TSHR, receptor do TSH; PDS, pendrina ou SLC26A4; H_2O_2, peróxido de hidrogênio; DEHAL, iodotirosina desalogenase tipo 1. Modificado de Vono-Toniolo e Kopp [12]

1.2.3a Defeito no sódio-iodo simportador (*NIS*)

O primeiro passo para a síntese de hormônios tireóideos é o transporte de iodo para dentro da célula folicular tireóidea por intermédio da proteína NIS [23].

O gene que codifica esta proteína está localizado no cromossomo 19 p13.2 e possui 15 exons [11]. Mutações neste gene são raras e levam ao HC com bócio. O volume tireoidiano encontra-se normal ou aumentado [4]. A TG está elevada com captação de iodo diminuída ou ausente [30].

1.2.3b Defeito na organificação do iodo

O iodeto transportado para dentro do folículo é rapidamente oxidado pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e se liga aos resíduos tirosina da TG. Depois, os resíduos de tirosina iodinados se acoplam para formar os resíduos iodotironina, monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT) e, posteriormente, T3 e T4. Tanto a iodinação como o acoplamento são catalisados pela TPO e necessitam de H_2O_2 na borda apical da célula folicular. A captação de iodo pode ser inibida por íons que tenham tamanho molecular e carga semelhantes, como o perclorato e o tiocianato. O defeito de organificação do iodo compromete a produção de peróxido (H_2O_2), a peroxidação do iodeto ou a iodinação das tirosinas [8]. É o mais comum dos defeitos de síntese de hormônios tireoidianos. Essa doença geralmente tem herança autossômica recessiva.

1.2.3b1 Defeito na tireoperoxidase (*TPO*)

Mutações no gene *TPO* causam defeito total ou parcial na organificação do iodo, dependendo do comprometimento da atividade enzimática. O gene que codifica a TPO está localizado no cromossomo 2 q25 e possui 17 exons [11]. Os pacientes apresentam HC e desenvolvem bócio como mecanismo compensatório. A cintilografia com iodo mostra captação normal ou aumentada e o teste do perclorato é positivo [23, 24].

1.2.3b2 Defeito na pendrina (*PDS ou SLC26A4*)

A síndrome de Pendred é causada por um defeito na pendrina, que é um transportador localizado na superfície apical da célula folicular, responsável pelo transporte de iodo e cloro [16]. O gene que codifica a pendrina (*PDS* ou *SLC26A4*) localiza-se no cromossomo 7 q31 e possui 21 exons [11]. As mutações causam HC, com desenvolvimento de bócio combinado à perda auditiva neurossensorial [31]. Tal surdez pode ser congênita ou surgir logo nos primeiros anos de vida. O seu diagnóstico é dado através de audiometria tonal. O mapeamento com iodo demonstra captação normal ou aumentada e o teste do perclorato também é positivo.

1.2.3b3 Defeito no *THOX2 (DUOX2)*

Mutações no gene *THOX2*, importante na geração de peróxido de hidrogênio, foram recentemente descritas como causa de HC associado a defeito na organificação [32]. O gene está localizado no cromossomo 15 q15.3 e possui 33 exons [11]. Os pacientes apresentam HC e desenvolvem bócio como mecanismo compensatório. A cintilografia com iodo mostra

captação normal ou aumentada e o teste do perclorato é positivo [23, 24]. A procura por mutações neste gene é realizada após afastar a presença de mutações mais frequentemente encontradas no gene *TPO.*

1.2.3c Defeito de síntese da tireoglobulina (*TG*)

A tireoglobulina é essencial para a organificação do iodeto e é o principal componente protéico do colóide. O gene que codifica a TG localiza-se no cromossomo 8 q24.2-24.3 e possui 42 exons [11]. Os pacientes com mutação neste gene apresentam HC com aparecimento de bócio desde o nascimento ou desenvolvimento acentuado e progressivo ao longo dos anos quando não tratados apropriadamente. Muitos portadores, quando adultos, apresentam sintomas de compressão de estruturas adjacentes decorrentes de aumento excessivo da tireóide [33]. Os níveis de TG geralmente são indetectáveis ou baixos, raramente normais, com a captação de iodo elevada [34] e o teste do perclorato é negativo [35].

1.2.3d Defeito na iodotirosina desalogenase (*DEHAL1*)

A incapacidade de deiodinação de MIT e DIT, após sua liberação da TG, provoca grave perda de iodeto, pois a MIT e a DIT não deiodinadas saem da tireóide e são excretadas na urina [36]. Esse defeito leva a HC grave e precoce com bócio, atraso físico e mental grave, com a possível aparência cretina. A glândula tireóide encontra-se normal ou aumentada [4]. A captação de iodo é elevada e precoce, usualmente, superior à tardia [34]. Os níveis de iodotirosinas séricas estão aumentados [23].

1.2.4 Resistência aos hormônios tireóideos

A resistência aos hormônios tireóideos compreende outra causa de HC que ocorre por mutações no gene do receptor do hormônio tireóideo (*TRβ*) na região de ligação do T3 ao receptor. A doença é autossômica dominante e antigamente era classificada como resistência central e periférica. Atualmente, sabe-se que a apresentação clínica da resistência aos hormônios tireóideos é indivíduo-dependente e tecido-dependente, ou seja, a mesma mutação pode apresentar fenótipos diferentes. Os pacientes apresentam graus variados de hipotireoidismo com altos níveis de T4 e T3, com nível inapropriadamente normal ou alto de TSH. A captação de iodo é elevada [34].

1.2.5 Hipotireoidismo secundário/ terciário

O hipotireoidismo secundário pode ocorrer por mutações em fatores de transcrição, como *LHX3, LHX4, HEXS1*, *POUF1* e *PROP1*, envolvidos na organogênese hipofisária. O hipotireoidismo, portanto, está associado às outras deficiências hipofisárias, sendo a deficiência de GH a mais frequente. Quando o teste de rastreamento é feito apenas com a dosagem do TSH, o diagnóstico muitas vezes pode não ser feito, pois os níveis deste hormônio podem estar normais. Clinicamente, o hipotireoidismo mais grave foi apenas descrito associado a mutações no *POUF1*. Nas demais, o hipotireoidismo só é diagnosticado tardiamente devido ao quadro clínico leve e associado principalmente à deficiência de GH.

1.3 QUADRO CLÍNICO

Apenas 10-15% dos pacientes com HC apresentam algum sinal ou sintoma que alerta o médico, durante o período neonatal [37]. Um dos sinais mais fidedignos encontrado é o alargamento da fontanela posterior com suturas cranianas abertas, resultante do atraso na maturação esquelética [38]. Outro sinal muito comum é a presença de hérnia umbilical. O bócio, quando presente, alerta para a disormonogênese como etiologia [39, 40].

A maioria dos recém-nascidos com HC apresenta-se clinicamente normal ao nascimento, dificultando o diagnóstico clínico [41].

1.4 DIAGNÓSTICO

14.1 Triagem neonatal

A triagem neonatal, através do “teste do pezinho”, teve início no Brasil em 1976, com a criação de um método pelo Dr. Benjamim Schimdt para detecção de fenilcetonúria e posteriormente para HC e outros erros inatos do metabolismo [42]. Esta triagem deve ser idealmente realizada nas maternidades entre três a cinco dias de vida. Infelizmente, no Brasil, esta ainda não é a média de realização desses exames na maioria dos serviços, tampouco de início de tratamento. Na APAE- São Caetano a média de início de tratamento é de 47,3 dias segundo dados de 2006 [43]. O exame consiste

de punção através da pele, a gota de sangue obtida é colocada em papel de filtro e transportada sob a forma de mancha de sangue seco. São duas as estratégias de rastreamento para hipotireoidismo congênito: dosagem inicial do T4 total ou dosagem inicial do TSH neonatal [44].

No primeiro método, a dosagem de T4 total na amostra é feita em uma primeira fase e o TSH é dosado apenas se os valores de T4 estiverem entre 10 a 20% abaixo do normal esperado. Essa estratégia detecta crianças com hipotireoidismo, incluindo os de causa secundária (hipotalâmico-hipofisário) e aqueles com elevação tardia do TSH. Por outro lado, não é capaz de detectar os casos de HC primário compensado, que apresentam valores de T4 na faixa normal e concentrações elevadas de TSH, o que constitui 20% da população com HC [44].

A segunda estratégia baseia-se na dosagem inicial do TSH. Considerando o hipotireoidismo primário como a forma mais comum de HC, o TSH encontra-se sempre aumentado. Essa estratégia, no entanto, não diagnostica os casos de hipotireoidismo central, porém esta etiologia é muito mais rara [1].

No Programa de Triagem Neonatal do Estado de São Paulo, o TSH é dosado pelo método imunofluorimétrico em amostra de sangue colhida em papel de filtro por punção do calcanhar, do terceiro ao quinto dia de vida. Utiliza-se, geralmente, como valor de corte o TSH neonatal acima de 20 μUI/mL. Pacientes com níveis de TSH > 20 μUI/mL devem ser convocados para consulta com endocrinologista infantil [44].

1.4.2 Confirmação do diagnóstico de hipotireoidismo

1.4.2a Dosagens laboratoriais. A confirmação dos resultados de triagem deve ser feita com a dosagem de T4 total, T4 livre e TSH séricos. Pacientes com valores séricos de TSH acima de 10 μUI/mL no período neonatal são diagnosticados como portadores de HC e o tratamento com levotiroxina sódica é prontamente instituído [45]. Excluídos os casos de hipotireoidismo transitório, confirma-se o diagnóstico de HC. O diagnóstico etiológico de HC permanente é realizado após os três anos de idade, época em que não haverá prejuízo no desenvolvimento intelectual por interrupção do tratamento.

1.4.2b Ultrassonografia. A ultrassonografia da região cervical é útil para localização da tireóide, determinando ectopia ou localização normal da glândula. A avaliação deve abranger toda a região cervical até a região submandibular. Além de depender da experiência do realizador, em alguns casos de hipoplasia ou ectopia, a ultrassonografia pode não ser sensível para o diagnóstico. Este exame também é útil para avaliar a presença de bócio. O padrão usado como referência para tamanho normal da tireóide apresenta grandes variações, pois depende da ingestão de iodo, sexo, idade, altura, superfície corpórea e estádio puberal. São descritos alguns trabalhos que citam referências para volume tireoidiano na infância [46-49]. No Estado de São Paulo foi realizado um estudo para correlacionar a ingestão de iodo e o padrão ultrassonográfico da tireóide em escolares [7]. Não existe padrão de normalidade para recém-nascidos até 6 anos no Brasil [7].

1.4.2c Cintilografia. A cintilografia com ^{131}I, ^{123}I ou ^{99}Tc é usada para determinação da função e auxilia na localização da tireóide ectópica [50]. Calcula-se o percentual de captação pela tireóide de um traçador. Tanto ^{131}I (meia-vida de 8,1 dias) como ^{123}I (meia-vida de 0,55 dias) emitem radiação gama, que permite a detecção externa e quantificação dos sítios de acúmulo. Esses isótopos (*I) são indistinguíveis fisiologicamente entre si e com o iodo natural (^{127}I), o que permite usá-los como traçadores. A meia-vida mais curta do ^{123}I é preferível, porque a radiação fornecida para a tireóide por quantidade administrada de ^{123}I é apenas 1% da usada para ^{131}I. Entretanto, seu custo é muito maior, assim como a sua disponibilidade [50].

Quando administra-se radioiodo, via oral ou intravenosa, o isótopo rapidamente se mistura com o iodo endógeno no líquido extracelular e começa a ser removido por dois sítios principais de clareamento: a glândula tireóide e os rins. Com a continuação do processo, os níveis plasmáticos de *I diminuem exponencialmente. O conteúdo intratireóideo de *I aumenta rapidamente durante as primeiras horas, depois a velocidade diminui até atingir um platô. A proporção de *I administrada que está acumulada na glândula tireóide é a função do clareamento do iodo pela tireóide e pelos rins. As medidas de captação são feitas após 24 horas, por conveniência e também porque os valores estão geralmente próximos ao platô. A captação geralmente indica a taxa de síntese dos hormônios tireóideos e, indiretamente, a velocidade de liberação do hormônio tireóideo para a circulação sanguínea. A exposição a excesso de iodo é a causa mais comum de captação abaixo do normal. Os valores abaixo da normalidade

indicam apenas introdução excessiva de iodo em qualquer apresentação: inorgânico, orgânico, ou elementar. As exposições mais frequentes são após uso de contraste iodado e amiodarona. A supressão pode durar semanas, variando individualmente.

Valores elevados de iodo urinário dosado em amostra isolada podem explicar um valor baixo de captação. Para evitar esta interferência, os pacientes podem fazer uma dieta restrita em iodo, evitando produtos que contém iodo (antissépticos, xaropes, produtos industrializados, entre outros) quinze dias antes do exame.

A captação da tireóide auxilia no diagnóstico e no diagnóstico diferencial do HC. Nas disgenesias tireóideas observa-se localização ectópica, desde a região sublingual até o mediastino superior. Nas hipoplasias, a captação está diminuída, mostrando localização tópica da glândula. Na resistência ao TSH, a captação está geralmente baixa, pela ausência de estímulo do mesmo para promover a entrada de iodo. No defeito de *NIS*, a captação está ausente pela incapacidade do transporte de iodo para dentro do folículo. Nos defeitos de *TPO*, *SLC26A4*, *THOX2*, *DEHAL1* e *TG*, a captação geralmente está aumentada inicialmente (2 horas), com rápido declínio do clareamento de iodo pela ausência de formação dos hormônios tireoidianos. Nesses casos, não há como diferenciar os defeitos, então, pode ser utilizado o teste do perclorato.

1.4.2d Teste de perclorato. O teste de perclorato é útil para o diagnóstico diferencial dos defeitos de organificação do iodo. O perclorato é um ânion

dissociado do sal de perclorato, que pode ser perclorato de potássio, de sódio ou de amônia [51]. Não há diferença entre o íon encontrado nos três sais acima. Sua ação consiste em competir com o iodeto bloqueando sua entrada na célula tireóidea por efeito em NIS e impedir a formação de hormônios tireóideos [52]. A oxidação e incorporação do iodeto são catalisadas pela peroxidase tireóidea. Quando sua atividade está subnormal por mutação de *TPO*, o transporte de iodeto para dentro do folículo é normal, entretanto pouco iodo é formado e incorporado. Assim, o iodeto inorgânico acumula-se na tireóide. Seguindo-se à administração de perclorato, ocorre a saída abrupta do iodeto acumulado [53].

No teste de perclorato padrão é administrado iodo radioativo e, após 2 horas, é realizada contagem cervical e administração de 1g de perclorato de potássio ($KClO_4$) via oral. As contagens tireóideas são obtidas em intervalos frequentes (a cada 10-15 minutos) por mais 2 horas. Em indivíduos normais, o acúmulo de iodo radioativo na tireóide cessa após a administração do $KClO_4$, com pouca perda da radioatividade tireóidea acumulada antes da indução do bloqueio da captação. Em indivíduos normais, o perclorato não libera mais que 5% do iodo radioativo. O teste é positivo quando há uma perda maior que 20%, indicando um defeito na organificação. A gravidade do defeito é proporcional à extensão da descarga de iodo radioativo da glândula e é completa quando virtualmente toda a atividade acumulada pela glândula é perdida. Geralmente, uma descarga entre 20 a 50% é compatível com defeito parcial na organificação, enquanto descarga maior que 50% com defeito completo [54]. O teste é positivo nos defeitos da organificação do

iodo e na síndrome de Pendred [53]. Esse teste é de difícil realização devido às dificuldades na ingestão da medicação, que causa desconforto gástrico e absorção variável, e consequentemente na sua interpretação [52]. Na Europa, o teste do perclorato é realizado após administração intravenosa (IV) de perclorato de sódio ($NaClO_4$), facilitando a administração em crianças e sua interpretação, sem descrição de efeitos colaterais.

A Tabela 1 resume os defeitos e alterações clínicas e de exames encontrados em cada defeito molecular na disgenesia tireoidiana e disormonogênese e descritos nesta dissertação.

Tabela 1- Características dos defeitos encontrados na disgenesia e disormonogênese tireoidianas

Defeito	Herança	Volume da tireóide	Captação de iodo	Teste do perclorato intravenoso	Outras características
TTF1	AD	ausente, hipoplasia, normal	ausente, baixa ou normal	negativo	insuficiência respiratória, coreoatetose, retardo mental
TTF2	AR	ausente, hipoplasia	ausente, baixa ou normal	negativo	palato em ogiva, atresia de coanas, cabelos eriçados
PAX8	AR	ausente?, hipoplasia, ectopia	ausente, baixa ou normal	negativo	má formação renal
TSHR	AR	hipoplasia	ausente, baixa ou normal	negativo	
NIS	AR	bócio	ausente ou baixa	negativo	
TPO	AR	bócio	aumentada	positivo	
SCL26A4	AR	bócio	aumentada	positivo	surdez neurossensorial
THOX2	AR	bócio	aumentada	positivo	
TG	AR	normal ou bócio	aumentada	negativo	bócio pode ser tardio
DEHAL1	AR	normal ou bócio	aumentada	negativo	bócio pode ser tardio, atrasos físico e mental graves, iodotirosinas séricas aumentadas

AD: autossômica dominante, AR: autossômica recessiva

2 OBJETIVOS

2.1 Determinar o diagnóstico etiológico dos pacientes com hipotireoidismo congênito a partir de dosagens hormonais, tireoglobulina e exames de imagem.

2.2 Estabelecer a importância do uso da ultrassonografia com Doppler colorido no diagnóstico etiológico.

2.3 Estabelecer a importância do uso de perclorato de sódio intravenoso no diagnóstico diferencial de hipotireoidismo congênito por disormonogênese.

2.4 Estudar os genes *PAX8* e *TSHR* em pacientes com hipotireoidismo congênito causado por disgenesia tireoidiana.

3 MÉTODOS

Os pacientes e seus familiares foram esclarecidos sobre os exames realizados e a importância do estudo e concordaram em participar. Foi assinado o termo de consentimento livre e esclarecido pelo paciente ou seu tutor legal (Anexo H).

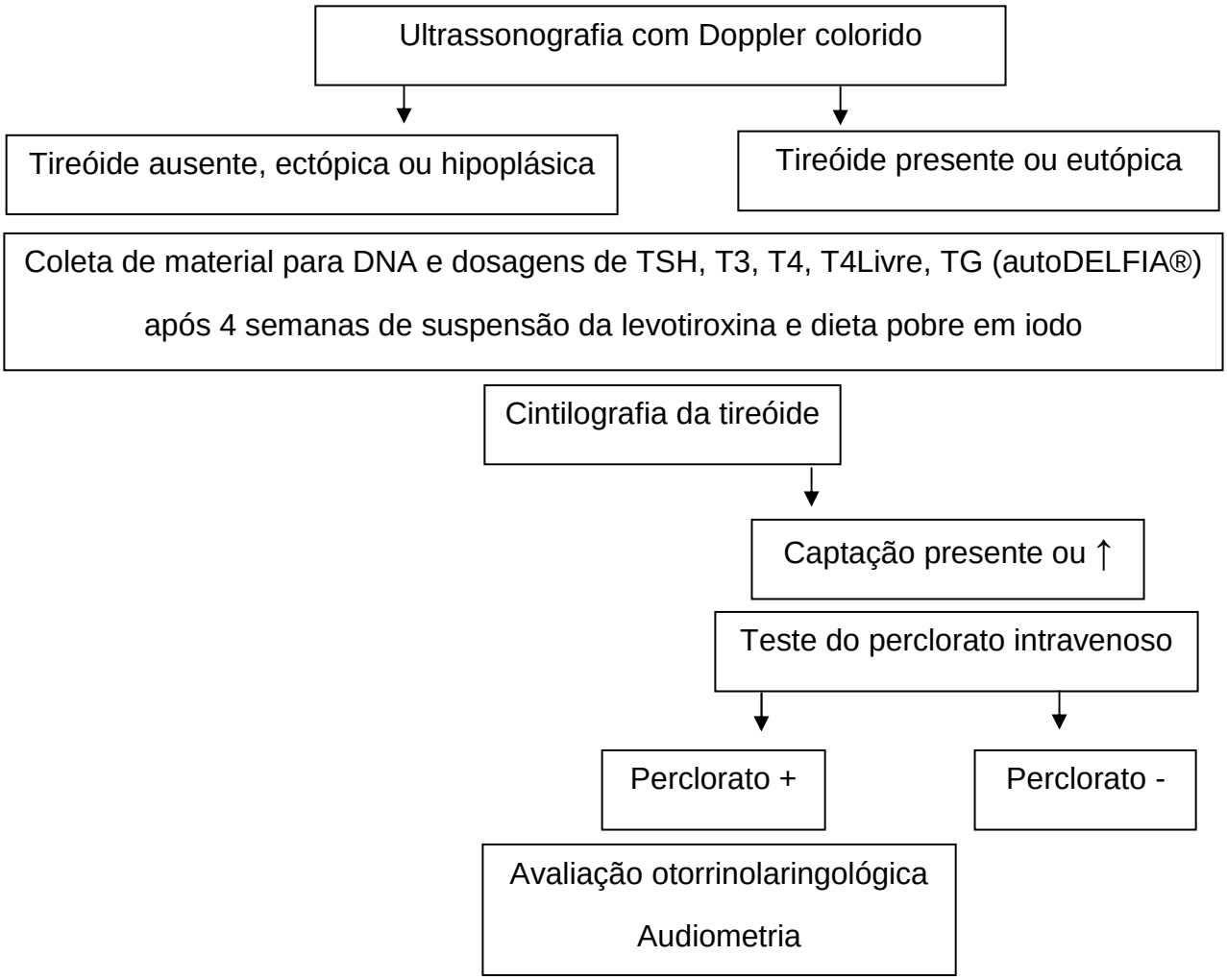
O estudo foi realizado de julho de 2006 a julho de 2008 e obteve auxílio FAPESP 2006/05800-1 e aprovação da CAPPesq – Protocolo de Pesquisa número 0030/07.

Noventa e seis pacientes encontravam-se em acompanhamento no Ambulatório da APAE - São Caetano no início do estudo. Todos os pacientes tinham sido submetidos ao “teste do pezinho” e encaminhados para seguimento com endocrinologista. As dosagens iniciais no “teste do pezinho” e confirmatórias (T4, T4 livre, TSH) foram realizadas no laboratório da APAE usando estojos comerciais (Autodelfia®, Wallac Oy, Turku, Finlândia). Foram excluídos do estudo pacientes com hipotireoidismo transitório causado por doença autoimune materna, uso materno de drogas anti-tireóideas durante a gestação e parto prematuro, restando sessenta pacientes elegíveis.

Completaram o estudo quarenta pacientes maiores de três anos portadores de HC primário e permanente.

O estudo compreendeu duas fases (Figura 3). Na primeira fase foi realizada a análise dos dados clínicos e exames laboratoriais e de imagem. Na segunda fase, foi realizado o estudo molecular dos casos de disgenesia tireoidiana.

Primeira Fase



Segunda Fase

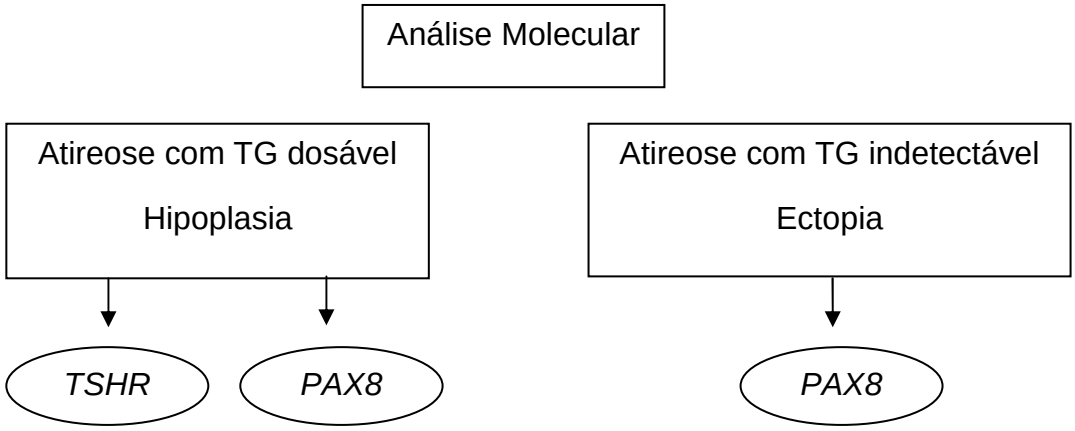


Figura 3: Fluxograma para diagnóstico dos pacientes com hipotireoidismo congênito. Adaptado de www.thyroidmanager.org

3.1 ESTABELECIMENTO DO DIAGNÓSTICO

3.1.1 Dados clínicos

A altura e peso de cada paciente foram aferidos em balança mecânica modelo Filizola com antropômetro divido de 1 em 1 cm. Os Z escores da altura e peso (de acordo com WHO-NCHS 1977), assim como o índice de massa corporal (IMC) (CDC-US 2000) foram obtidos através do programa *Growth-analyser* (www.growthanalyser.org).

3.1.2 Dosagens hormonais

Os valores do "teste do pezinho" e TSH neonatal foram obtidos retrospectivamente através de dados de prontuário.

As dosagens após os três anos de idade foram realizadas no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular – ICHC-FMUSP após suspensão da levotiroxina por quatro semanas.

3.1.2a Dosagens de T3, T4, T4L, TSH e TG foram realizadas em todos os pacientes por ensaio imunofluorimétrico, usando estojos comerciais (Autodelfia®, Wallac Oy, Turku, Finlândia).

3.1.2b Dosagens de anticorpos anti-TG foram realizadas em todos os pacientes por ensaio imunofluorimétrico indireto, usando estojo comercial (Autodelfia®, Wallac Oy, Turku, Finlândia). Valores inferiores a 35 UI/mL foram considerados normais.

3.1.3 Avaliação ultrassonográfica da tireóide

Os pacientes foram submetidos à avaliação ultrassonográfica com Doppler colorido para determinar a localização da glândula (tópica ou ectópica) e tamanho (hipoplásico, normal ou aumentado). O exame foi realizado sob a supervisão de um radiologista experiente (Dra. Maria Cristina Chammas) do Departamento de Radiologia – INRAD – HC-FMUSP. Foi utilizado o aparelho PHILLIPS com transdutor linear de multifrequência 7,5-12 MHZ. O paciente foi colocado em decúbito dorsal horizontal, com leve flexão da cabeça para trás. Toda a região cervical até a região submandibular foi avaliada.

O volume de cada lobo tireoidiano e istmo foram determinados pela altura x largura x profundidade x $\pi/6$. O volume total resultou da soma dos lobos e istmo, que foi comparado de acordo com o sexo, idade, altura e superfície corporal (Anexo E). Nas imagens com Doppler, o fluxo colorido indica a vascularização cervical. O fluxo para o transdutor apresenta-se em vermelho, enquanto o azul indica o fluxo na direção inversa [55].

O diagnóstico final foi dado calculando-se o desvio-padrão do volume tireoidiano obtido em relação à referência normal, quando disponível. Na presença de mais de uma comparação, o resultado final foi a média dos resultados (Anexo F).

3.1.4 Cintilografia da tireóide

Os pacientes realizaram este teste após quatro semanas de dieta pobre em iodo e suspensão da levotiroxina. Foi administrado ^{131}I via oral na dose de 500-1.000 µCi no início do teste com medidas de captação após 2, 6 e 24 horas. Foi realizada cintilografia com ^{99}Tc no dia seguinte para avaliação da morfologia glandular (topografia e tamanho).

3.1.5 Teste do perclorato de sódio ($NaClO_4$) intravenoso (PSIV)

Os pacientes que apresentaram glândula tópica ao ultrassom com tamanho normal ou bócio foram submetidos ao teste PSIV, uma semana após a cintilografia da tireóide. O teste PSVI consistiu, inicialmente, na administração via oral de 10 µg de ^{131}I, com o paciente em jejum. Após 120 minutos, foi realizada captação cervical e 100 mg de $NaClO_4$ foram injetados por via intravenosa. O decréscimo da radioatividade na tireóide foi determinado a cada 20 minutos durante 100 minutos. O paciente permaneceu deitado durante o exame, com a cabeça estendida, a 25 cm do aparelho. A porcentagem de iodo liberada pela tireóide foi calculada como a relação entre a captação de 60 minutos após o PSIV e a captação imediatamente anterior a administração do $NaClO_4$, multiplicada por 100. Consideramos o teste positivo quando há um valor de descarga acima de 20%, indicando defeito de incorporação de iodeto.

3.1.6 Avaliação com otorrinolaringologista e audiometria

Os pacientes que apresentaram teste PSIV positivo realizaram avaliação com otorrinolaringologista e audiometria tonal com fonoaudióloga para afastar surdez neurossensorial.

3.2 ESTUDO MOLECULAR

3.2.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído a partir de leucócitos periféricos como previamente descrito [56]. Nos casos em que houve dificuldade na coleta, a extração de DNA foi realizada a partir de “swab” oral [57]. A concentração do DNA foi medida em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A relação 260/280 igual a 1,8 foi utilizada para caracterizar a pureza do material. As amostras foram armazenadas a 4°C até sua utilização.

3.2.2 Estudo dos genes

Reação de polimerização em cadeia

O DNA genômico foi amplificado através da reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando-se iniciadores (“primers”) específicos para cada gene e seguindo os protocolos padrões para cada fragmento. Toda a região codificadora e as regiões intron-exon dos genes *PAX8* e *TSHR* foram amplificadas através de PCR (Anexos A e B, respectivamente). Os produtos

de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídio (0,001 mg/mL).

A sequência completa do gene que codifica o *PAX8*, incluindo as regiões intron-exon, foi amplificada através de PCR e sequenciada utilizando os iniciadores descritos no Anexo A.

O volume final das reações foi de 25µL, utilizando o kit da Promega (Promega, Madison, WI, EUA) nas seguintes concentrações: 1X Green GoTaq® Reaction Buffer, DNA genômico 100-300ng, 0,2mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), GoTaq® DNA Polimerase 0,5U e 5µM de cada *"primer"*.

As amostras foram denaturadas a 95ºC por 3 minutos, seguidas de 40 ciclos de amplificação de: 95ºC por 30 segundos, 60ºC por 60 segundos e 72ºC por 1 minuto. Depois do último ciclo, as amostras foram incubadas a 72ºC por 10 minutos.

A sequência completa do gene que codifica o *TSHR,* incluindo as regiões intron-exon, foi amplificada através de PCR e sequenciada utilizando os iniciadores descritos no Anexo B.

O volume final das reações foi de 25µL, utilizando o kit da Promega (Promega, Madison, WI, EUA) nas seguintes concentrações: 1X de Green GoTaq® Reaction Buffer, DNA genômico 100-300ng, 0,2mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), GoTaq® DNA Polimerase 0,5U e 5µM de cada "primer".

As amostras foram denaturadas a 95ºC por 3 minutos, seguidas de 40 ciclos de amplificação de: 95ºC por 30 segundos, temperatura de cada jogo de "primer" por 30 segundos e 72ºC por 1 minuto. Depois do último ciclo, as amostras foram incubadas a 72ºC por 10 minutos.

Sequenciamento automático

Os produtos de PCR foram tratados inicialmente com a enzima de purificação ExoSAP-IT® (GE Healthcare, Estados Unidos). O produto de PCR purificado foi sequenciado usando o protocolo de reação ABI PRISM BigDye Terminator (Perkin-Elmer, Applied Biosystems) nos sequenciadores automáticos ABI PRISM 3100 e 3130 xl "Genetic Analyser" (Perkin-Elmer, Applied Biosystems). Os resultados foram analisados por comparação da sequencia obtida com a disponível em banco de dados da internet para os genes *PAX8* e *TSHR* (www.ensembl.org/Homosapiens).

O gene *PAX8* foi estudado nos pacientes com os diagnósticos:

a) Ectopia

b) Atireose com TG indetectável ou detectável

c) Hipoplasia

O gene *TSHR* foi estudado nos pacientes com os diagnósticos:

a) Atireose com TG detectável

b) Hipoplasia

4 RESULTADOS

4.1 Estabelecimento do diagnóstico etiológico

Foram estudados 40 pacientes, sendo 28 meninas, com idade que variou de 3 a 24 anos (média de 6,5 anos).

4.1.1 Antropometria

O peso das crianças variou de 15 a 57,5 quilos (média de 25,3 Kg), a altura variou de 95,5 a 160 centímetros (média de 118,2 cm) e o índice de massa corporal (IMC) 13,7 a 24 kg/m^2 (média de 17,3). A maioria dos pacientes apresentava peso, altura e IMC adequados para sexo e idade. Uma paciente (caso 3) apresentava baixa estatura por mutação no *SHOX* (Z -2,6).

O Anexo C mostra os dados antropométricos de cada paciente quanto a idade, sexo, peso, altura, índice de massa corporal (IMC) e seus respectivos Z escores.

4.1.2 Dosagens hormonais para determinação do diagnóstico etiológico

Todos os pacientes, com exceção dos casos 9 e 26, realizaram os exames em hipotireoidismo após a suspensão da levotiroxina por 4

semanas. Os pacientes 9 e 26 apresentaram dosagens de TSH sem medicação que confirmaram o diagnóstico de HC.

A média de TSH encontrada, após quatro semanas sem levotiroxina, foi 129,9 µUI/mL (Tabela 2).

Foi observado que os pacientes 6, 25, 32, 34 e 36 apresentavam níveis de TSH compatíveis com hipotireoidismo subclínico após quatro semanas sem a medicação. Estes pacientes foram mantidos sem tratamento por mais dois a três meses para confirmação do hipotireoidismo. Todos apresentaram elevação do TSH (maior ou igual a 15 µUI/mL) com aparecimento de sintomas (astenia, obstipação intestinal), sendo a terapêutica retomada.

Os valores de T3, T4 e T4 livre variaram de 14 – 217 ng/dL , <1,6 – 15,8 µg/dL e < 0,3 – 2,7 ng/dL, respectivamente (Tabela 2).

Os valores de tireoglobulina (TG) variaram de <1 – 287 ng/mL. Três pacientes (casos 5, 19 e 20) apresentaram anti-TG positiva (> 35 UI/mL). Um paciente (caso 20) apresentava TG 1,6 ng/mL, porém com anti-TG positiva, interferindo na sua interpretação.

Tabela 2- Valores hormonais e de tireoglobulina nos pacientes estudados

	T3 (ng/dL)	T4 (µg/dL)	T4 livre (ng/dL)	TSH (µUI/mL)	TG (ng/mL)
Total de amostras	40	33	40	40	40
Menor valor	14	<1,6	<0,3	0,2*	<1
Maior valor	217	15,8*	2,7*	320,5	287
Mediana	110,5	5,7	0,7	87,1	27,9
Média	117,4	6,5	0,8	127,6	47,7
DP	61,4	4,2	0,5	115	60,9
Valor de referência	<5 a: 105-269 5-12 a: 94-241 12-20 a: 72-214 20-50 a: 70-200	1-5 a: 7,3-15,0 5-12 a: 6,4-13,3 > 12: 4,5-12,0	0,7-1,5	1-5 a: 0,7-6,0 6-10 a: 0,6- 5,4 11-15 a: 0,5- 4,9 16-20 a: 0,5- 4,4 > 20 a: 0,4-4,5	1,7-35

a: anos, TG: tireoglobulina, * coleta em vigência de tratamento

Comparação entre TSH no "teste do pezinho" e confirmatório e TSH após três anos de idade

Através de dados obtidos em prontuário, comparamos os níveis de TSH no teste do pezinho, TSH neonatal confirmatório e TSH após três anos de idade (após suspensão da levotiroxina por quatro semanas).

Não houve correlação do TSH neonatal confirmatório com o TSH após três anos de idade pelo teste t pareado (n=17; r=0,333, p=0,191). Utilizando o teste não-paramétrico (Wilcoxon), não houve significância entre TSH no

“teste do pezinho” e TSH neonatal confirmatório (p=0,084), TSH no “teste do pezinho” e TSH após três anos (p=0,124), assim como TSH neonatal confirmatório e TSH após três anos (p=0,981).

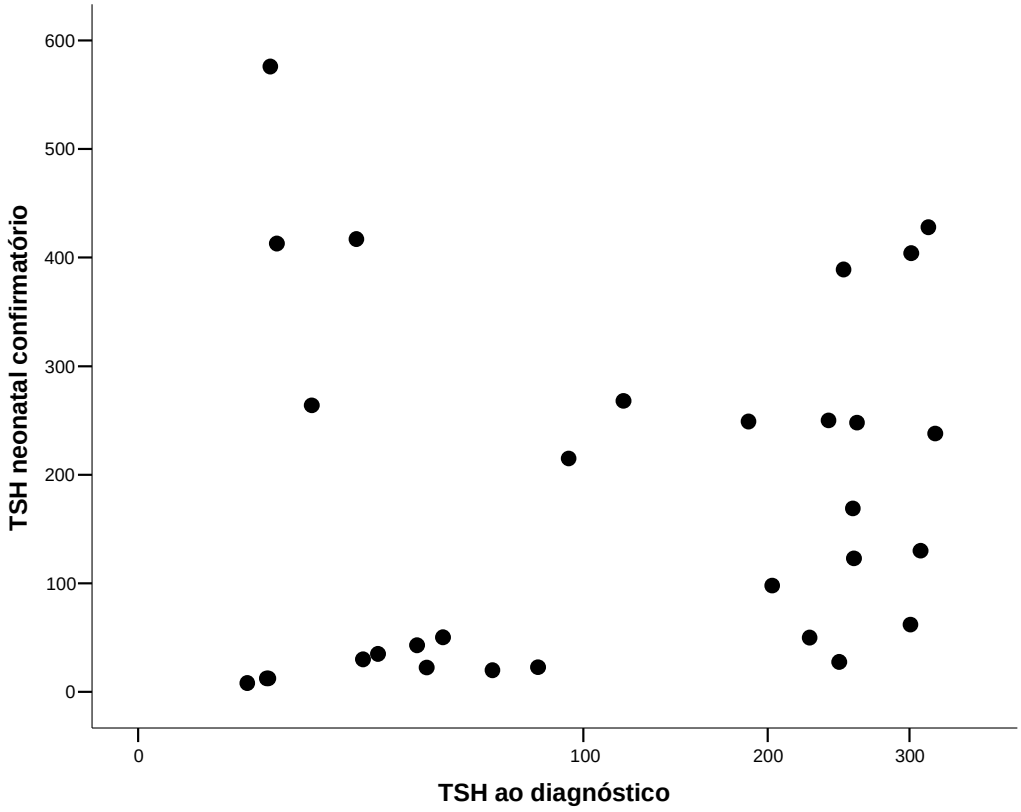


Figura 4: Gráfico de comparação entre os níveis de TSH neonatal confirmatório e TSH ao diagnóstico (após 3 anos)(p=0,981).

4.1.3 Ultrassonografia com Doppler colorido (USDC) da tireóide

Todos os quarenta pacientes realizaram USDC sem intercorrências e foram classificados de acordo com as referências disponíveis para estatura, sexo, idade e superfície corpórea (Anexo E). Os resultados encontrados foram vinte e um pacientes com tireóide tópica (53%), sendo dez pacientes com volume normal, oito pacientes com hipoplasia e três pacientes com

bócio; oito pacientes com tireóide ectópica (20%), sendo uma ectopia associada à hemiagenesia e onze pacientes com atireose (27%) (Figura 5). O resultado de USDC de cada paciente encontra-se no Anexo F.

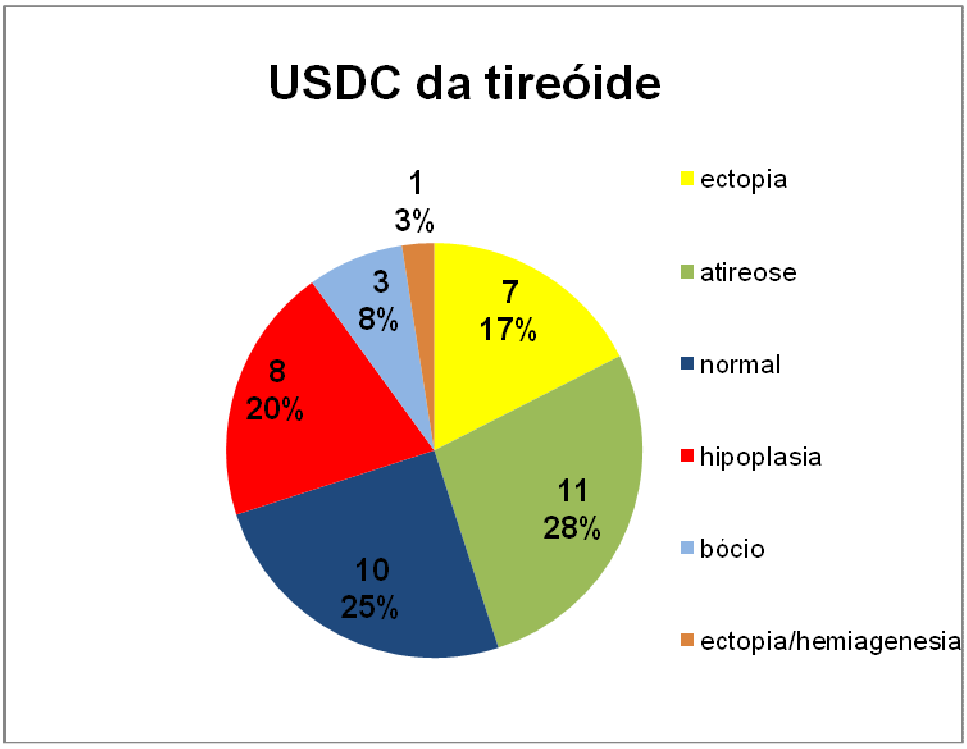


Figura 5: Distribuição percentual do diagnóstico etiológico usando a ultrassonografia com Doppler colorido nos pacientes estudados (número de casos e percentual)

Ao exame com Doppler colorido, a glândula tireoidiana normal apresentava vascularização difusa como mostra a Figura 6.

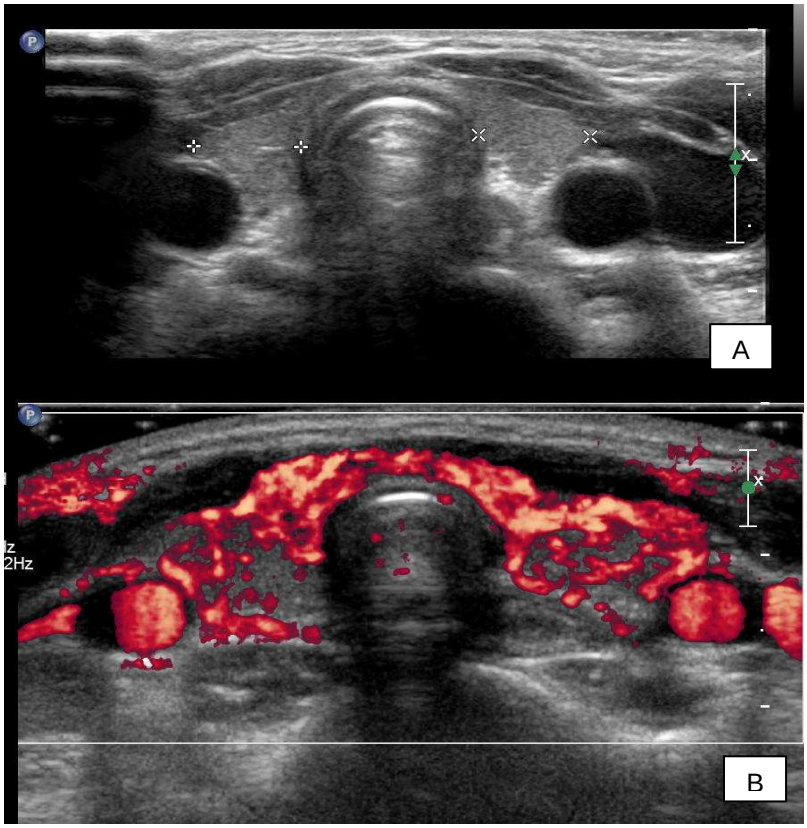


Figura 6: Ultrassonografia de paciente com hipotireoidismo congênito mostrando glândula tireoidiana de localização e tamanho normal (A) e exame com Doppler colorido demonstrando vascularização difusa da glândula normal e das artérias carótidas (B)

O tecido tireoidiano ectópico mostrou vascularização ao Doppler colorido, semelhante à glândula tireoidiana tópica, como mostra a Figura 7.

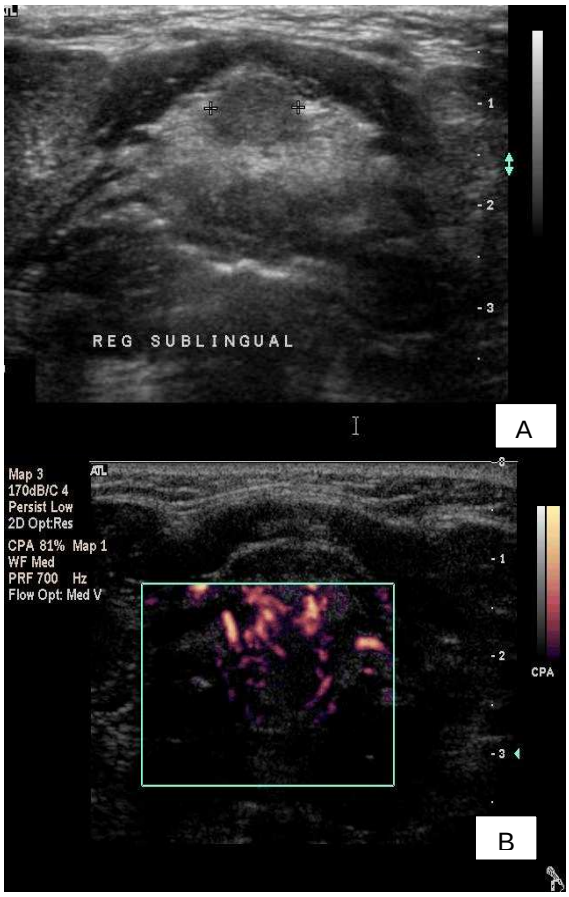


Figura 7: Ultrassonografia da região cervical mostrando tecido glandular em região submandibular (A) e presença de vascularização deste tecido ao Doppler colorido (B), denotando tecido tireoidiano ectópico

Observou-se também tecido tímico identificado como tecido com parênquima mais heterogêneo e hiperecóico em relação à tireóide, podendo estar localizado na loja tireoidiana (Figura 8). Ao Doppler colorido, o tecido tímico não apresenta vascularização, diferindo da glândula tireoidiana.

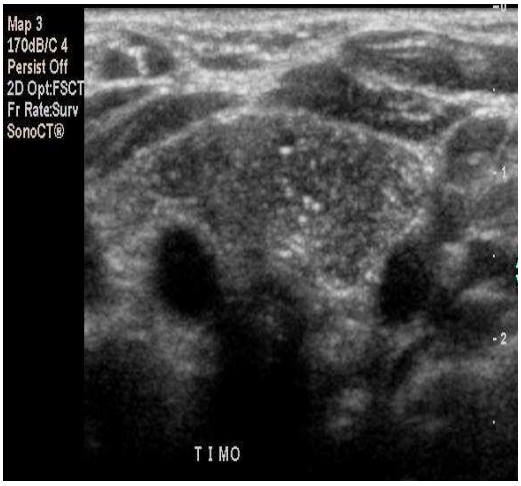


Figura 8: Ultrassonografia da região cervical mostrando tecido tímico com parênquima mais heterogêneo em comparação com tecido tireoidiano normal

Também foi observada a presença de gânglio em região cervical anterior, diferindo da glândula tireoidiana por apresentar textura mais homogênea e hipoecogênica em relação ao tecido tireoidiano e ausência de fluxo ao Doppler colorido (Figura 9).

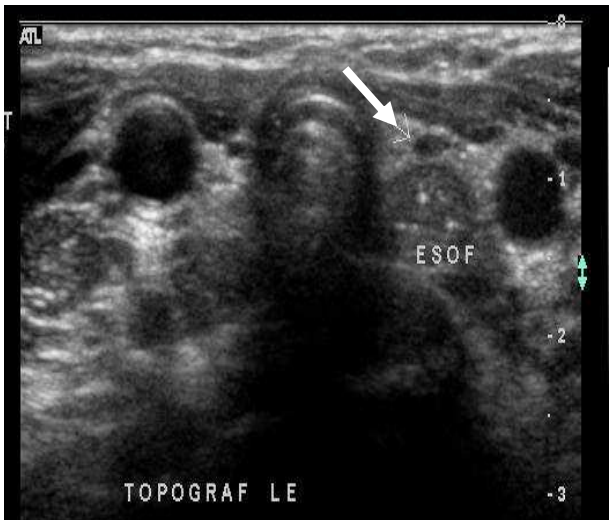


Figura 9: Ultrassonografia da região tireoidiana, identificando tecido ganglionar (seta), por apresentar textura mais homogênea e hipoecogênico em comparação com tecido tireoidiano normal

4.1.4 Cintilografia da tireóide

Os exames de cintilografia da tireóide foram interpretados por dois médicos radiologistas individualmente e em conjunto. Todos os pacientes realizaram medida da captação de 2 e 24 horas sem intercorrências. Diagnosticamos tireóide ectópica em treze pacientes (32%), tireóide tópica em vinte pacientes (50%) e atireose em sete pacientes (17%). Entre os pacientes com tireóide tópica, três apresentavam bócio, doze glândula de tamanho normal e cinco hipoplasia (Figura 10 e Tabela 3).

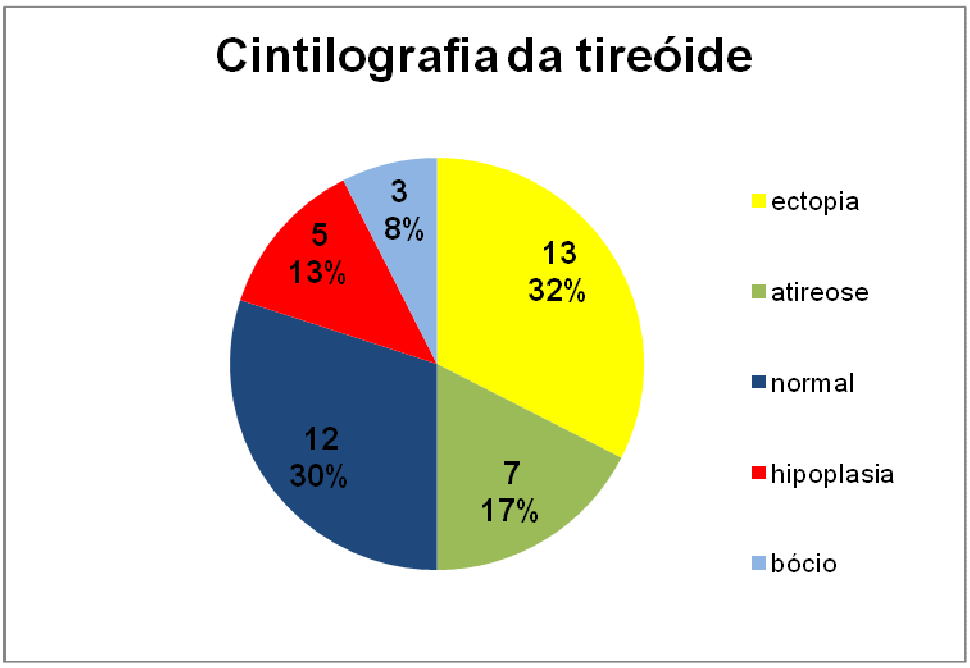


Figura 10: Distribuição do diagnóstico etiológico dos 40 pacientes estudados através da cintilografia de tireóide (casos e percentual)

A captação mostrou-se aumentada em 2 horas em dez pacientes, sugestivo de defeito de síntese (defeito da organificação ou tireoglobulina). Nenhum paciente com ultrassonografia normal ou bócio apresentou glândula

com captação diminuída, descartando a possibilidade de defeito de NIS ou contaminação.

Tabela 3- Número de pacientes e resultado à cintilografia e captação da tireóide

Total de Pacientes	Cintilografia	Captação
3	Bócio	Hipercaptante
7	Normal	Hipercaptante
5	Normal	Normocaptante
5	Hipoplasia	Normocaptante
13	Ectopia	Hipocaptante
7	Atireose	Hipocaptante

O resultado de cada paciente encontra-se descrito no Anexo G.

É de se notar a captação do radiotraçador pela boca e glândulas salivares (Figura 11).

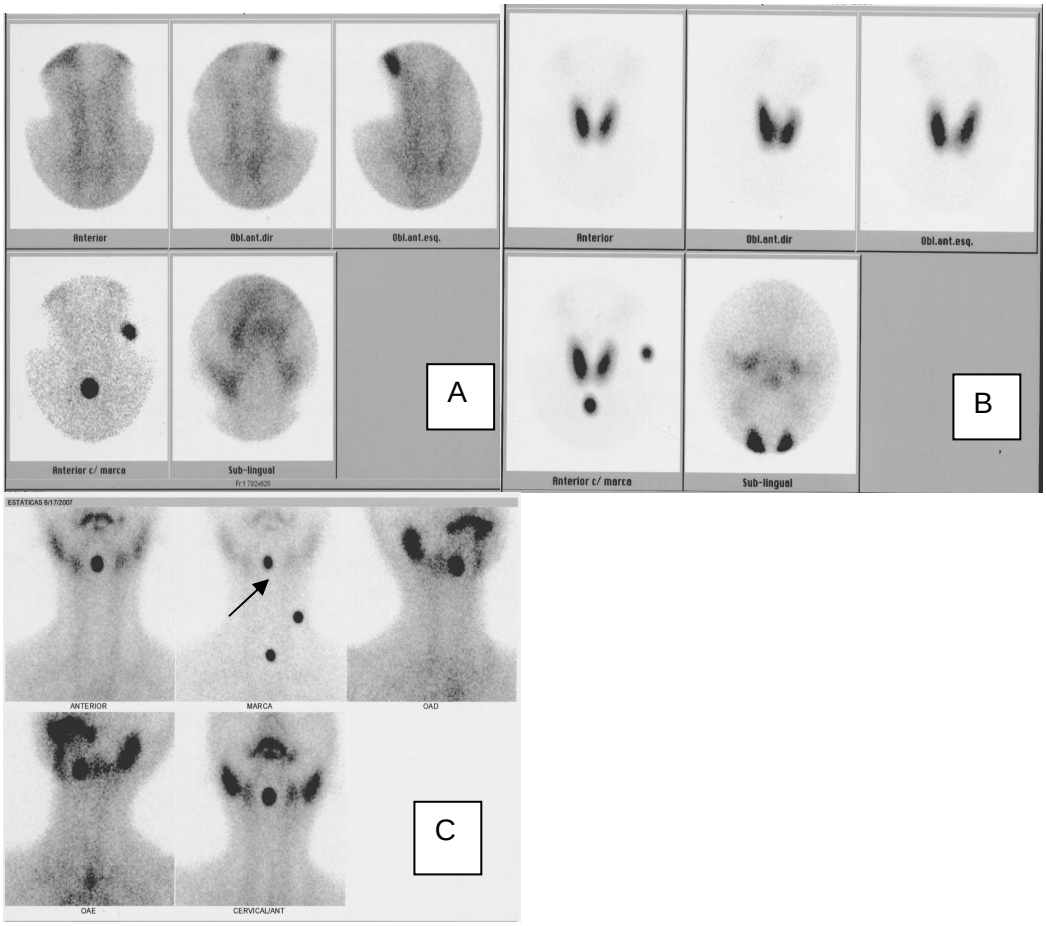


Figura 11: Cintilografia da tireóide em crianças com hipotireoidismo congênito. (A) As imagens mostram ausência de captação em qualquer região cervical indicando atireose; (B) glândula aumentada de tamanho; (C) glândula ectópica sublingual (seta). Observar também intensa captação da boca e glândulas salivares

4.1.5 Teste do perclorato de sódio intravenoso (PSIV)

Os pacientes que apresentaram glândula normal ou bócio ao USDC com captação aumentada à cintilografia foram submetidos ao teste PSIV. Apenas uma criança apresentou um episódio de vômito no início do teste, com melhora espontânea após poucos minutos. Nove pacientes realizaram o teste PSIV, sendo seis com teste positivo, ou seja, queda da captação maior que 20%. (Tabela 4). Nos pacientes que apresentaram teste positivo,

notamos a queda da captação nos primeiros 20 minutos após a injeção do $NaClO_4$. Nos testes negativos, a captação de iodo manteve-se constante durante todo o teste (Figura 12). Os resultados de cada paciente encontram-se no Anexo G.

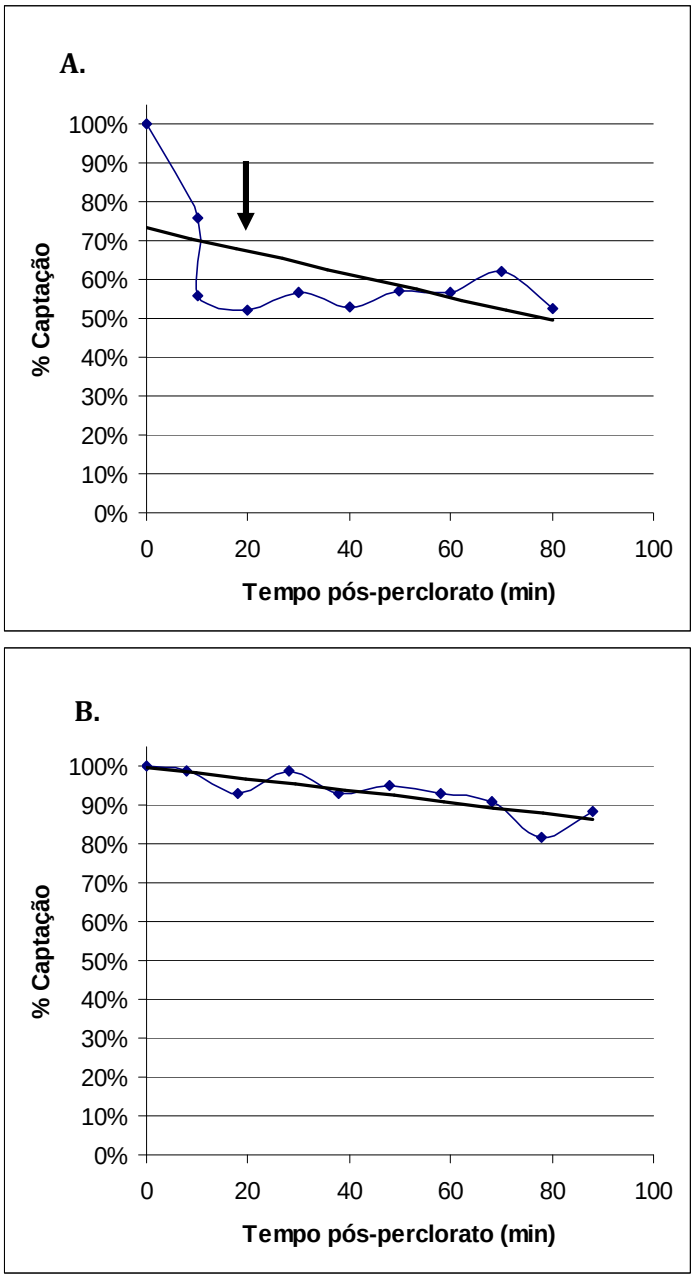


Figura 12: Gráficos de percentual de queda da captação de iodo após administração de perclorato de sódio intravenoso ao longo do tempo. Teste positivo (painel A) e negativo ou normal (painel B)

Tabela 4 – Resultados de ultrassonografia, cintilografia da tireóide e teste do perclorato intravenoso

Total de Pacientes	USDC	CINT	Captação	PSIV
2	Bócio	Bócio	hipercaptante	Negativo
1	Bócio	Bócio	hipercaptante	Positivo (queda de 67,5%)
1	Normal	Normal	hipercaptante	Negativo
5	Normal	Normal	hipercaptante	Positivo (queda de 21,2 a 85,7%)

CINT: cintilografia, PSIV: teste do perclorato de sódio intravenoso, USDC: ultrassonografia com Doppler colorido

4.1.6 Avaliação com otorrinolaringologista e audiometria

Seis pacientes apresentaram teste do perclorato positivo e realizaram consulta com otorrinolaringologista e avaliação audiométrica com fonoaudióloga para descartar a presença de surdez neurossensorial. A avaliação clínica e a audiometria tonal foram normais em quatro pacientes excluindo, portanto, a surdez neurossensorial. Dois pacientes apresentaram alterações à audiometria, mas foram compatíveis com otite secretora à avaliação clínica. O caso 5 também realizou avaliação auditiva, por não ter realizado o teste PSIV, que foi normal.

4.1.7 Comparação entre USDC da tireóide e cintilografia

Ao compararmos os resultados de USDC da tireóide e cintilografia dos quarenta pacientes estudados encontramos discordância em nove pacientes (Tabela 5). A discordância mais frequente foi a presença de glândula

ectópica à cintilografia, que não foi detectada pela USDC em cinco pacientes. Apenas uma paciente (caso 38) evidenciou glândula ectópica sublingual associada à hemiagenesia direita, onde a cintilografia detectou apenas tecido ectópico. Dois pacientes com hipoplasia à USDC foram diagnosticados como glândula de tamanho normal pela cintilografia. Um paciente (caso 21) apresentava cisto tireoidiano em uma glândula hipoplásica ao USDC, cuja cintilografia mostrou atireose.

Tabela 5 - Diagnóstico discrepante encontrado entre os métodos de ultrassonografia com Doppler colorido e cintilografia da tireóide

Total de Pacientes	USDC	Cintilografia
5	Atireose	Ectopia
2	Hipoplasia	Normal
1	Hipoplasia (cisto)	Ausente
1	Hemiagenesia e ectopia	Ectopia

USDC: ultrassonografia com Doppler colorido

Houve correlação estatisticamente significante entre USDC e cintilografia da tireóide nos quarenta pacientes estudados (Kappa = 0,745; $p<0,0001$). Observamos concordância de 100% nos casos de bócio, ectopia e glândula normal (Tabela 6).

Tabela 6 - Comparação dos diagnósticos dados pela ultrassonografia com Doppler colorido e cintilografia

		CINT					
		ATIREOSE	BÓCIO	ECTOPIA	HIPOPLASIA	NORMAL	TOTAL
USDC	ATIREOSE	6 (54,5%)	0 (0%)	5 (45,5%)	0 (0%)	0 (0%)	11 (100%)
	BÓCIO	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)
	ECTOPIA	0 (0%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (100%)
	HIPOPLASIA	1 (12,5%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (62,5%)	2 (25%)	8 (100%)
	NORMAL	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	10 (100%)
	TOTAL	7 (17,5%)	3 (7,5%)	13 (32,5%)	5 (12,5%)	12 (30%)	40 (100%)

Comparação entre dosagem de tireoglobulina e cintilografia

Os níveis de tireoglobulina foram correlacionados com o diagnóstico determinado pela cintilografia. Foram excluídos os pacientes com anticorpo anti-TG elevado e um paciente com TG muito baixa compatível com defeito de TG. Os valores médios de TG encontrados foram de 46,2 ng/mL (mediana 28,4), 6,2 ng/mL (mediana 4,7), 42,6 ng/mL (mediana 45) e 122,6 ng/mL (mediana 70,2) para ectopia, atireose, hipoplasia e defeito de síntese, respectivamente (Figura 13). Nos casos de atireose, notamos o nível mais

alto de TG no paciente com cisto tireoidiano não identificado pela cintilografia (TG de 18,7 ng/mL).

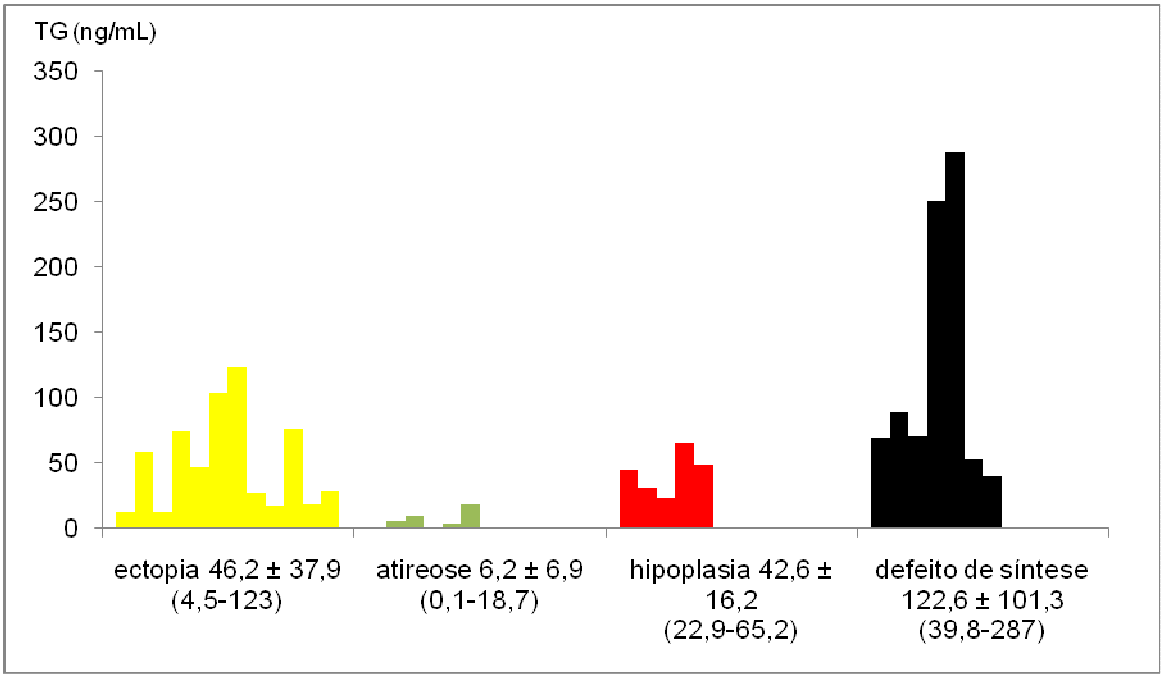


Figura 13: Níveis de tireoglobulina (média, desvio-padrão e variação) de acordo com o diagnóstico cintilográfico nos pacientes estudados

Comparação entre TG, USDC, cintilografia e teste PSIV para o diagnóstico etiológico definitivo

Os resultados de USDC, CINT e TG foram comparados e combinados e os seguintes diagnósticos etiológicos foram definidos: treze pacientes com ectopia (33%), oito com hipoplasia (20%), sete com provável defeito de síntese da tireoperoxidase ou *THOX2* (18%), seis com atireose (15%), três com provável defeito de síntese de tireoglobulina (8%) e três com diagnóstico a esclarecer (3%) (Figura 14).

Os resultados de USDC, CINT e TG de cada paciente encontram-se no Anexo G.

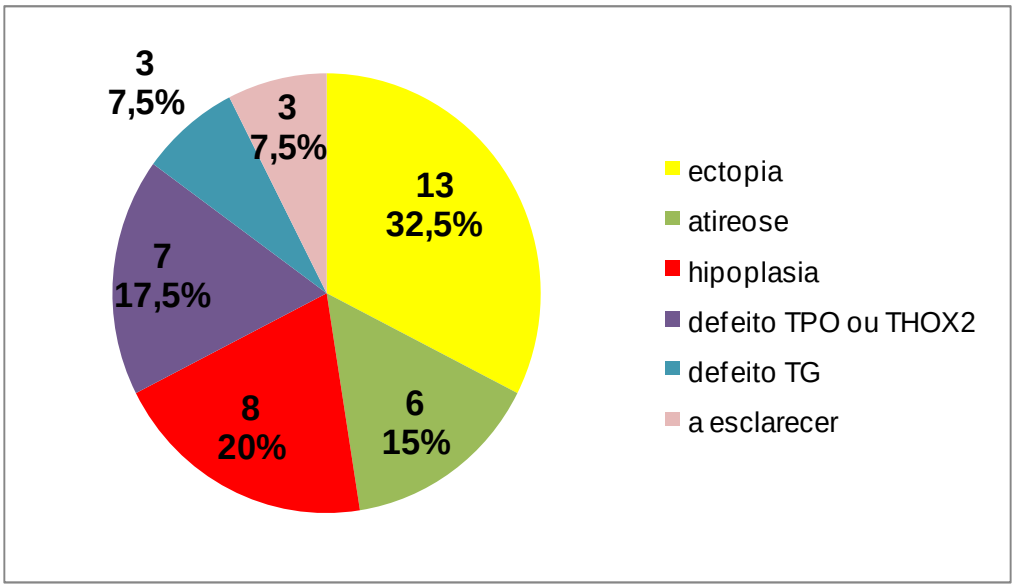


Figura 14: Distribuição do diagnóstico etiológico de 40 pacientes com hipotireoidismo congênito após determinação de tireoglobulina, USDC, cintilografia e teste do perclorato (número de casos e percentual)

4.2 Estabelecimento do diagnóstico molecular

De acordo com os resultados do diagnóstico definido e do fluxograma descrito (Figura 3) foram estudadas mutações para os genes *PAX8* e *TSHR* em vinte e sete pacientes com diagnóstico etiológico de ectopia, hipoplasia e atireose.

4.2.1 Gene *PAX8*

Foram estudados vinte e sete pacientes para mutação no *PAX8*, sendo treze pacientes com ectopia, oito pacientes com hipoplasia, três com

atireose e níveis de TG detectáveis e três pacientes com atireose e TG indetectável.

Não foram encontradas mutações ou polimorfismos na região codificadora e nas regiões exon-intron nesse gene na amostra estudada.

4.2.2 Gene *TSHR*

Foram estudados onze pacientes para mutação no *TSHR*, sendo oito pacientes com hipoplasia e três com atireose que apresentavam TG detectável.

O polimorfismo previamente descrito Glu727Asp, localizado no exon 10, foi identificado em heterozigose em dois pacientes (casos 25 e 27) com diagnóstico clínico de hipoplasia. O mesmo polimorfismo foi identificado em homozigose nos demais pacientes (Figura 15).

O percentual de heterozigose descrito para este polimorfismo é de 18,4% (DP 24,1) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

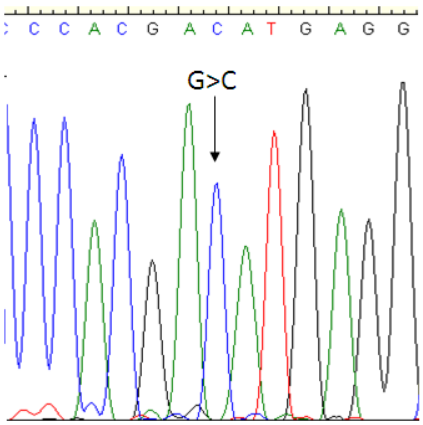


Figura 15: Eletroesferograma de parte do exon 10 do gene *TSHR*. A seta indica a localização da troca em homozigose de G>C, indicando o polimorfismo Glu727Asp

5 DISCUSSÃO

O hipotireoidismo congênito é uma doença grave que pode levar a retardo mental irreversível, caso não seja diagnosticada e tratada corretamente. Seu tratamento é feito a partir do uso da levotiroxina sódica [1].

A definição etiológica do HC é importante, porque a dose da medicação pode variar de acordo com a etiologia da doença. Mathai *et al*, em 2008, mostraram o uso de doses maiores de levotiroxina no início do tratamento de acordo com o diagnóstico de HC [58]. Foram utilizadas doses mais elevadas (15 µg/kg/dia) para pacientes com atireose, 12 µg/kg/dia para aqueles com ectopia e 10 µg/kg/dia para disormonogênese [58]. Com isso, houve uma normalização do TSH (<8 mUI/L) após duas semanas do início da terapêutica, o que é recomendado para que haja desenvolvimento cognitivo normal [58].

O diagnóstico etiológico da doença é realizado a partir da pesquisa do defeito genético. Na prática, porém, o diagnóstico etiológico do hipotireoidismo congênito engloba exames como ultrassonografia da tireóide, cintilografia e teste do perclorato. A dosagem de TG não costuma ser feita de rotina nos serviços de Triagem Neonatal. Como é marcador da

presença de tecido tireoidiano, mais sensível que a cintilografia, poderia ser mais uma ferramenta diagnóstica [59]. A avaliação combinada dos valores de TG junto a exames de imagem é ferramenta importante no diagnóstico etiológico e direcionamento preciso para a pesquisa do distúrbio molecular no HC [59].

A TG produzida reflete a quantidade de tecido tireoidiano diferenciado presente e funcionante, observação feita no seguimento de pacientes tireoidectomizados por carcinoma da tireóide [60]. Neste estudo, observamos que os níveis de TG mais elevados foram encontrados nos pacientes com defeito de síntese de organificação, indicando uma produção aumentada para compensar o defeito de síntese de hormônios tireóideos. Níveis muito baixos ou não dosáveis de TG foram observados nos casos de atireose ou defeito de síntese de TG.

Na atireose, um valor baixo, porém detectável, de TG indica a existência de tecido tireoidiano, porém, a cintilografia não pôde detectar tecido tireoidiano, provavelmente pela baixa resolução da imagem para pouco tecido. No defeito de síntese de TG, é de se esperar nível baixo causado pela formação de uma proteína anômala, incapaz de ser detectada pelos métodos usados. A diferença entre pacientes com atireose e deficiência de TG está na utilização do exame ultrassonográfico, que indicaria a presença de tireóide de volume normal ou aumentado nos casos de deficiência de TG.

Nos casos de ectopia e hipoplasia tireoidiana, os níveis de TG foram extremamente variáveis. Provavelmente, isso ocorreu pela grande variação do tamanho dos tecidos ectópicos e hipoplásicos.

Miras *et al*, em 2007, propuseram valores de referência para o período neonatal que auxiliaria prontamente o diagnóstico de HC já nos primeiros dias de vida [59]. Na infância, ainda não foram determinados os valores de referência normal de TG, assim como valores de referência de acordo com áreas suficientes ou não de iodo. Um outro fator limitante é a presença de anticorpos anti-TG. Pelo método imunofluorimétrico, na vigência de anti-TG, a dosagem de TG pode apresentar-se como um valor mais baixo ou até indetectável, como observamos neste estudo (paciente 20). Toda dosagem de TG, portanto, deve ser feita concomitante com a dosagem de anticorpo anti-TG [61].

A ultrassonografia da tireóide é um exame rápido, que pode ser realizado a qualquer momento, sem necessidade de preparo e relativamente barato [48].

Sasaki *et al*, em 2006, compararam o uso de ultrassonografia modo B, USDC e ressonância em pacientes com HC [55]. Foram avaliados apenas onze pacientes portadores de HC e a USDC mostrou superioridade na definição diagnóstica comparada aos demais métodos. O exame de USDC foi realizado em hipotireoidismo, evidenciando a tireóide com aumento do fluxo ao Doppler, mostrando um estado hiperfuncionante, o qual contribui para a definição diagnóstica, especialmente de tireóide ectópica.

No presente estudo, a USDC foi feita de maneira segura, indolor e rápida, mesmo em crianças pequenas. Ela foi útil na localização normal da glândula, avaliação de tamanho e de componente cístico, que não pôde ser avaliado pela cintilografia, corroborando com a revisão sobre exames de imagem na tireóide de Naik *et al,* em 1998 [62].

Dos quarenta pacientes estudados neste trabalho, treze apresentaram glândula ectópica à cintilografia, mas apenas oito foram visualizadas à USDC (61%). A utilização do Doppler colorido aumenta a sensibilidade deste método em comparação à utilização apenas do modo B. A ultrassonografia, mesmo com Doppler, ainda apresenta limitações para a detecção de tecido ectópico. Foi observado que as glândulas ectópicas não visualizadas à USDC eram de tamanho bastante reduzido, evidenciado pelas imagens de cintilografia, o que poderia ser uma justificativa para a limitação da ultrassonografia nesses casos. Como o diagnóstico de disgenesia tireoidiana compreende os casos de ectopia ou atireose, apesar do falso diagnóstico de atireose obtido pela USDC, não há prejuízo quanto ao tratamento permanente e precoce com dose maior de levotiroxina nos casos de ectopia.

Por outro lado, a USDC apresenta vantagem em relação à CINT na detecção de tecido não funcionante. Um paciente (caso 21) apresentou cisto tireoidiano em uma glândula hipoplásica diagnosticado pela USDC, que não foi detectado pela CINT. Ainda, uma paciente (caso 38) apresentava hemiagenesia associada à ectopia, ambas evidenciadas pela ultrassonografia. A cintilografia, porém, detectou apenas o tecido ectópico. Essa paciente teve seu exame ultrassonográfico repetido por outro médico,

que encontrou os mesmos resultados. Fugazzolla *et al* descreveram um paciente com a presença de ectopia e hemiagenesia, idêntica ao caso descrito neste trabalho [63]. É de se esperar que o tecido tireoidiano tópico (hemiagenesia) fosse funcionante e, portanto, o tecido captante e detectado pela cintilografia. Apenas o tecido ectópico, porém, foi visualizado, provavelmente por competição pelo ^{131}I, havendo maior acúmulo na ectopia. Todo exame ultrassonográfico depende de um operador experiente. Na casuística deste estudo, foi constatado tecido tímico e gânglio, que poderiam ser confundidos com tecido tireoidiano. A utilização de Doppler e da experiência do operador foram essenciais para o correto diagnóstico diferencial.

Existem diversos valores de referência de volume normal de tireóide para crianças na faixa escolar (acima de seis anos), levando-se em consideração área pobre ou rica em iodo, idade, sexo, altura, estádio puberal e superfície corpórea. Entretanto, não existem parâmetros para a primeira infância [46-49]. Foi escolhido o critério de altura, que é sempre determinada e de fácil avaliação, e tal critério foi comparado com dados obtidos no Estado de São Paulo, pressupondo a mesma ingesta de iodo [7, 46]. No estudo em questão, assim como no estudo de Perone *et al*, o número de casos de hipoplasia tireoidiana foi alto (20%) em comparação a maioria dos estudos existentes na literatura [64]. Provavelmente, esse fato se deve ao rigor utilizado na caracterização do volume tireoidiano através do uso de tabelas existentes comparativamente.

A cintilografia da tireóide é considerada o padrão-ouro no diagnóstico etiológico do HC. Este exame, porém, deve ser feito em hipotireoidismo idealmente antes da introdução da levotiroxina. Devido às dificuldades de ser realizado em recém-nascido e seu alto custo, geralmente é feito após os três anos de idade. É necessário preparo com dieta pobre em iodo por duas semanas. O fato de permanecer sem ingestão de chocolate e leite foi um ponto negativo citado por todos os pais e pacientes. Além disso, muitos responsáveis tiveram receio do uso do contraste radioativo.

A cintilografia pode ser realizada com iodo e/ou tecnécio. O iodo é importante para avaliar a função da glândula e o tecnécio para avaliar sua morfologia. Idealmente, deve ser utilizado ^{123}I e não ^{131}I porque o segundo é mais tóxico. No entanto, por ser caro e de difícil disponibilidade, não foi possível utilizá-lo no estudo em questão.

A cintilografia mostrou-se altamente eficiente no diagnóstico de ectopia, porém não consegue definir o tamanho da glândula precisamente. Os pacientes com disormonogênese apresentam captação elevada nas 2 horas iniciais, direcionando o diagnóstico para defeito de organificação.

Alguns estudos sugerem o uso do TSH recombinante para a realização da cintilografia. Com isso, não há necessidade de suspender a medicação quatro semanas antes do exame. Entretanto, existem poucos estudos em crianças com carcinoma de tireóide e com hipotireoidismo congênito [65, 66].

Neste trabalho, foi realizado o teste PSIV, que apresentou efeitos colaterais em apenas 10% dos pacientes, além de ser mais rápido que o

teste oral. O principal inconveniente encontrado para a realização do teste PSIV foi a necessidade de manter o paciente com a cabeça estendida e sem se movimentar para a realização da captação. A possibilidade de ser realizado com menor tempo de duração facilitaria a sua realização.

O teste de perclorato de sódio intravenoso foi realizado duas horas após a ingestão de iodo e com duração de cem minutos. Aqui, o teste foi considerado positivo quando a descarga foi maior que 20%, semelhante a Perone *et al* [64]. Alguns trabalhos consideraram teste positivo com descarga maior que 15% ou 10% [67, 68]. O valor de corte para definir um teste de perclorato positivo permanece duvidoso e variável de acordo com os trabalhos. Pode-se também dividir o defeito na organificação do iodo em parcial ou completo de acordo com o resultado do teste [69]. O defeito é considerado parcial quando a descarga de iodo encontra-se entre 10 a 90% e total quando é maior que 90% [70].

Neste trabalho, foi observado que, nos pacientes com teste positivo, a queda da captação do iodo ocorreu precocemente, já aos 20 minutos do teste, mantendo-se até o final. Assim, sugerimos que o teste pode ser realizado em menor tempo. Há dificuldade de conseguir voluntários sem doença tireoidiana na faixa pediátrica para realização do teste. A realização em paciente sabidamente com disormonogênese e seus parentes também é difícil. Com o auxílio do estudo molecular, poderemos determinar o percentual de queda e correlacionar com a gravidade do defeito (completo ou parcial).

Quando foram comparados os resultados dos exames realizados neste estudo, foi encontrada boa correlação entre a USDC e a cintilografia (Kappa 0,745 e p<0,001). Kreisner *et al*, em 2003, realizaram um trabalho onde mostraram correlação muito boa entre a ultrassonografia e a cintilografia da tireóide em pacientes com HC (Kapppa 0,866 e p<0,001) [71]. Houve apenas um caso de discordância com ultrassonografia normal e cintilografia que não mostrou captação. No trabalho de Kreisner *et al,* no entanto, o autor considerou os casos de atireose e ectopia como mesma etiologia. Assim, quando comparados em conjunto, a concordância foi maior. Kreisner *et al* sugeriram a investigação inicial do diagnóstico etiológico de HC com ultrassonografia [71]. Caso a glândula tireoidiana fosse ausente, o diagnóstico provável seria disgenesia tireoidiana por atireose ou ectopia. Se a glândula estivesse presente, seriam necessários outros exames para esclarecimento diagnóstico [71]. No presente estudo, sugerimos inicialmente a realização de ultrassonografia com Doppler colorido associada à dosagem sérica de TG. Com isso, é possível determinar com mais precisão os casos de disgenesia tireoidiana (atireose ou ectopia) e aqueles com provável defeito de síntese hormonal. Dessa forma, a combinação entre USDC e TG determinaria os pacientes que realmente necessitariam realizar a cintilografia. Com isso, os pacientes com atireose e ectopia não necessitariam interromper a medicação para definição do diagnóstico etiológico.

A cintilografia continua sendo o exame padrão-ouro para o diagnóstico etiológico do HC. Nesta casuística, a cintilografia poderia ter sido realizada

apenas nos pacientes com glândula tópica e TG normal para determinar os defeitos de *TPO/THOX2*, *NIS* ou *PDS*.

Observamos que os pacientes que realizaram o teste do perclorato apresentaram os maiores níveis de captação de iodo nas primeiras 2 horas. Assim, não haveria a real necessidade de sua realização, apenas a avaliação com otorrinolaringologista e audiometria diferenciaria os casos de defeito de *TPO* e *PDS*.

Finalmente, é importante o diagnóstico molecular através da pesquisa de mutações nos genes conhecidos em pacientes com HC.

O encontro de mutações em pacientes com disgenesia é bastante raro. Machia *et al*, em 1998, estudaram 145 pacientes com disgenesia e encontraram 3 mutações no *TSHR* [20]. Perone *et al*, em 2004, estudaram 45 pacientes com atireose e ectopia e encontraram uma mutação no *TSHR*, além de 30 pacientes com hipoplasia e hipertirotropinemia e não encontraram mutação no *PAX8* [64]. Lewinski *et al,* em 2006, estudaram 33 pacientes com disgenesia e encontraram uma mutação no *PAX8.* Tatò, em 2007, estabeleceu uma incidência de mutação de 6,7% no *PAX8* e 18,8% para o *TSHR* nos casos de hipoplasia, sem haver “hot-spots” para mutação [72].

Embora houvesse o cuidado de selecionar adequadamente os pacientes com disgenesia, nenhuma mutação foi encontrada nos genes *TSHR* e *PAX8* no presente estudo. Nesta casuística, nenhum dos pacientes referia consanguinidade e não apresentavam más formações, principalmente

cardíacas, que pudessem estar mais associadas a mutações nos genes *PAX8* e *TSHR*. Quatro pacientes apresentavam casos de disgenesia na família (casos 2 e 6 são irmãos e casos 23 e 35).

Foi realizado o diagnóstico etiológico e direcionamento da pesquisa molecular em trinta e sete dos quarenta pacientes estudados. Não foi possível definir o diagnóstico etiológico em três pacientes desta casuística (casos 6, 32 e 36). Todos eles apresentavam níveis elevados de TSH, acompanhados de dosagens normais de tireoglobulina, além de USDC e CINT normais. Acreditamos estar diante de pacientes portadores de resistência ao TSH ou, eventualmente, defeito de *TG* [73]. Aguardamos os dados de sequenciamento dos genes *TSHR* e *TG* para definição dos mesmos.

Finalmente, apesar de não ter sido objetivo do estudo, foi observado que o diagnóstico final dos pacientes com HC pode ser feito sem a necessidade da realização de tantos exames. Após essas observações, sugerimos um fluxograma que pode ser utilizado após o diagnóstico neonatal (Figura 16).

Em seguida à confirmação do resultado obtido através do “teste do pezinho”, deve ser realizada ultrassonografia e dosagem de tireoglobulina. Se a glândula estiver ausente com TG indetectável ou baixa, o diagnóstico provável será atireose. Se a glândula estiver ausente com TG presente, deve-se suspeitar de glândula ectópica que não pode ser vista ao USDC. Nos casos de glândula tópica e normal com TG indetectável ou baixa, deve-

se suspeitar de defeito de síntese de TG. Nos casos de glândula tópica e normal com TG normal ou elevada, deve-se suspeitar dos outros defeitos de síntese de hormônios tireoidianos.

Naqueles pacientes em que não é definido o diagnóstico com USDC e TG, está indicada a realização de cintilografia da tireóide. Este exame deve ser feito preferencialmente ao diagnóstico, mas, se não for possível, após os três anos de idade.

Se os exames hormonais confirmam hipotireoidismo e a cintilografia mostra uma glândula hipocaptante, provavelmente trata-se de um defeito de síntese do *NIS*. Se a glândula é hipercaptante, deve ser feita audiometria para afastar surdez neurossensorial. Se presente, o diagnóstico provável é defeito na *PDS*. Nos casos restantes está indicado o PSIV. Se negativo, provavelmente trata-se de um defeito de *TG* com TG normal. Se positivo, defeito de *TPO* ou *THOX2*, sendo que esses dois últimos só poderão ser diferenciados a partir do estudo molecular. Os outros defeitos são extremamente raros e geralmente acompanhados de características específicas.

Com esse fluxograma, utilizando TG e CDUS como ferramentas fundamentais para determinar o diagnóstico etiológico do hipotireoidismo congênito, gastos desnecessários assim como exames excessivos difíceis de serem realizados em crianças podem ser evitados.

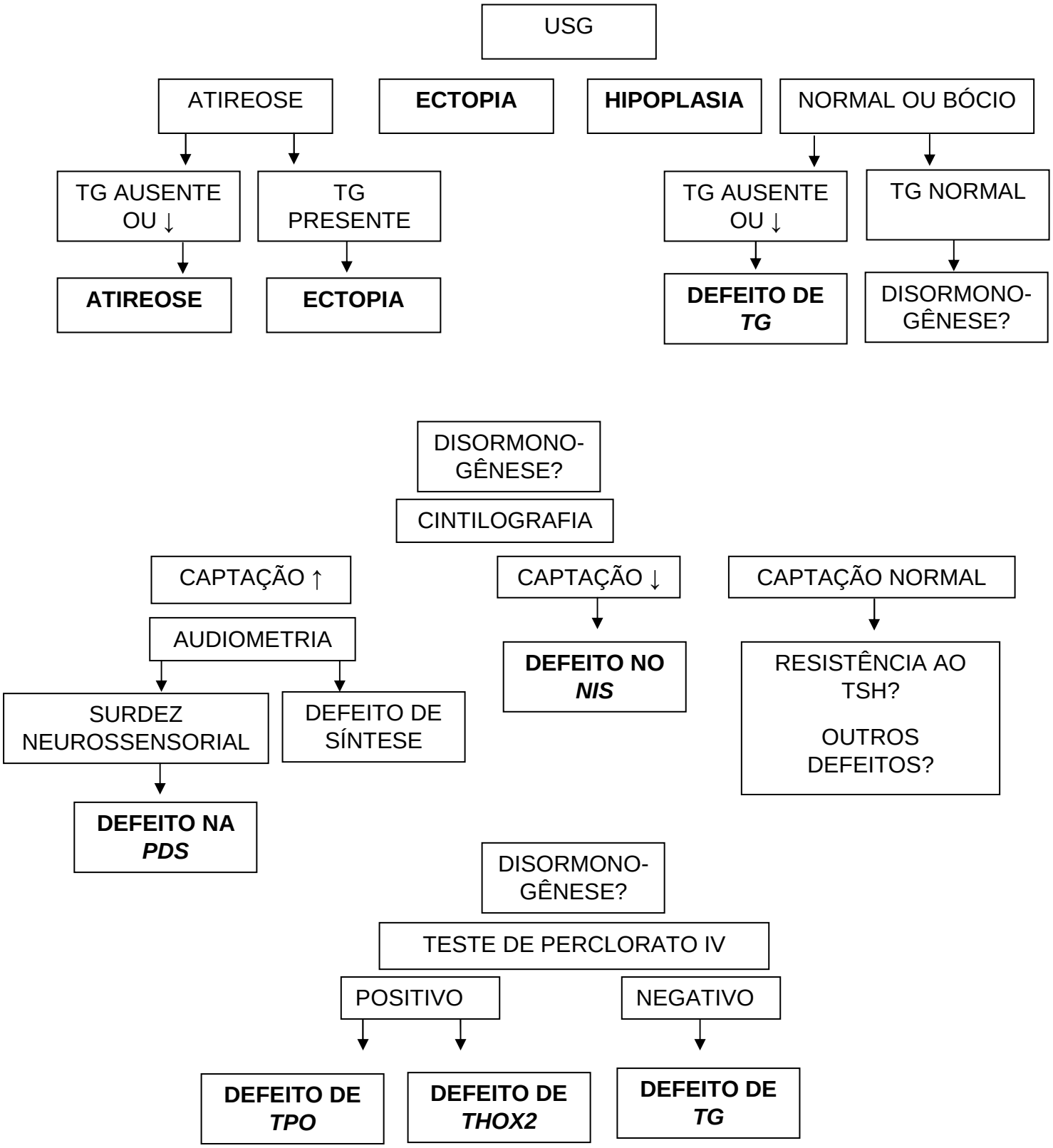


Figura 16: Fluxograma de diagnóstico para hipotireoidismo congênito

6 CONCLUSÕES

6.1 Determinamos o diagnóstico etiológico de 37 pacientes com hipotireoidismo congênito a partir de dosagens hormonais, tireoglobulina e exames de imagem.

6.2 A ultrassonografia com Doppler colorido mostrou-se importante no diagnóstico etiológico do hipotireoidismo congênito, especialmente quando associada à dosagem de tireoglobulina.

6.3 O teste do perclorato de sódio intravenoso mostrou-se seguro no diagnóstico diferencial do hipotireoidismo congênito por disormonogênese.

6.4 Não identificamos mutações nos genes *TSHR* e *PAX8* nos pacientes com disgenesia tireoidiana.

7 ANEXOS

Anexo A: Sequência dos “primers" utilizados para amplificação do *PAX8.*

Exon	“primer” Sense	“primer” Anti-sense
Prom	5’GTGACAATTTTGTTAGCCTG3’	5’CGGTTTTATCCCGCTGAGG3’
1	5’GACATGGCTGAGTGGACTCAG3’	5’CAACCTCAGCCTAGCCTAG3’
2	5’ CACTCCCAATCCTTGATC3’	5’CTCGGGGACCTGACCACACC3’
3	5’ATTGGGTAATTCTTTGGGATTC3’	5’AAGAGACAAGAAAGCCCCTGG3’
4	5’AGGGGTGTCAAAAAGGCGACTG3’	5’TCCCCTTCAGCATACCCA3’
5	5’TCTCCCTCTCCCCCACTG3’	5’GGACTTTGTAGGGGCTCTGCAT3’
6	5’GAGCATGAATAGATAGGTCCC3’	5’ATTCTCCAAATGAGCCTGTG3’
7	5’GTCTCTGTGCGCTGACTTCT3’	5’GTCAGGCGGAAGGTGT3’
8	5’CCTCCCCGCCATCTCACACC3’	5’CTATGGCGGCGGGTGGGA3’
9	5’GCCCCCATGGTCCAACTGAC3’	5’GTGGGACACAAGGAGCAAGA3’

Prom: região promotora. Sequências obtidas de Kopp P [74] e Macchia PE [20]

Anexo B: Sequências dos “primers” usados para amplificação do *TSHR*.

Exon	“primer” Sense	“primer” Anti-sense
1	5’GAGGATGGAGAAATAGCCCCGAG3’	5’CACTACTTCGGGCTGTTATTGAG3’
2	5’TAAGGTGAATTA TTA GAAAAGC3’	5’GAACTATCTTGTGCAAATCTCTT3’
3	5’GCAGAATCCATGAGGGTTGT3’	5’TCTTTGGTCGAGGGTAAC3’
4	5’ACCCTGTGGCGTAAATGCATAT3’	5’GGGCTGGGTCCGATATGTGGTAA3’
5	5’AGTTTGACTACAGGTTGTCTTC3’	5’CGAAATGAATAGAAGTTGGATGG3’
6	5’TATTGTGTCCTGTTATTTAAGTGCATA3’	5’GAGATCTGTCATATATATAC3’
7	5’TGGGATACATATGTGGGACCTG3’	5’ACAACCAGTGTGATTCAGACC3’
8	5’TGGTCACATTTTATTCTGATATTTGT3’	5’TATAAGAAAACATACAGAACGAG3’
9	5’TCATCTCCCAATTAACCTCAGG3’	5’GCT TCCAATTTCCTCTCCAC3’
10a	5’CCTAGGCTCAAGCAATCCAC3’	5’TGTCAAAAGCTTGTAGAGTC3’
10b	5’GATGAGATCATTGGTTTTGG3’	5’ACCGACCAACATCATGAGT3’
10c	5’GCTCCTCATCGCCTCTGTAG3’	5’GTTATATACGGTCTCGTTCTCC3’
10d	5’GTATCTGCCTGCCCATGGAC3’	5’TCTCCTTACCTAACCGTGTC3’
10e	5’CTTGCTGGTACTCTTCTATCC3’	5’ GTTCCCCTACCATTGTGAGTAG3’

Sequências obtidas de Camilot M [75]

Anexo C: Dados antropométricos dos pacientes estudados

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)	Z	Altura (cm)	Z	IMC (kg/m^2)	Z	SC (m^2)
1	F	6,7	24,5	0,9	131,5	2,4	14,2	-0,9	1,0
2	M	4,5	25,6	3,0	110	0,8	21,2	3,1	0,9
3	F	7,5	20,8	-0,7	109	-2,6	17,5	0,9	0,8
4	F	3,7	19,5	1,8	107,5	2,0	16,9	1,0	0,8
5	F	4,9	21,2	1,3	112,5	1,1	16,8	1,0	0,8
6	M	3,4	18	1,3	99,5	0,3	18,2	1,7	0,7
7	F	24,5	49	ND	160	-0,6	19,1	-0,7	1,5
8	F	19,0	45	ND	152	-1,9	19,5	ND	0,8
9	M	4,4	15,8	-0,8	104	-0,4	14,6	-0,9	0,7
10	F	4,1	15,7	-0,3	107	1,2	13,7	-1,6	0,7
11	M	3,2	22,5	3,9	104	1,8	20,8	3	0,8
12	F	7,6	23	-0,1	128	0,7	14,1	-1,0	0,9
13	F	4,1	21	1,9	111,5	2,3	16,9	1,0	0,8
14	F	3,7	17	0,7	103	0,9	16	0,5	0,7
15	F	5	19,5	0,7	113	1,0	15,8	0,5	0,8
16	F	2,9	15,3	0,8	102	2,1	14,7	-0,9	0.7
17	F	3	18	2,0	95,5	0,4	19,7	2,3	0,7
18	M	10,3	32,5	0	141	0,3	16,4	-0,2	1,1
19	F	3,7	18,6	1,4	105	1,4	16,9	1,0	0,7
20	F	3,4	15	0	101	1,0	14,7	-0,7	0,6

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)	Z	Altura (cm)	Z	IMC (kg/m^2)	Z	SC (m^2)
21	M	3,9	20,8	2	110	1,9	17,2	1,2	0,8
22	M	9,8	37	0,9	142	0,9	18,6	0,8	1,2
23	F	5,6	29,3	2,5	125	2,8	18,8	1,7	1,0
24	F	4,7	15,3	-1	103	-0,8	14,4	0,7	0,7
25	F	8,3	50,5	2,7	145	2,7	24	2,1	1,4
26	F	13,3	45	-0,3	152	-0,9	19,5	0,2	1,4
27	M	4,9	21,7	1,3	112	0,6	17,3	1,3	0,8
28	F	3,1	17	1,4	101	1,6	16,7	0,7	0,7
29	M	8	28	0,7	128	0,2	17,1	0,7	1,0
30	F	5,6	17,4	0,6	109	-0,7	14,7	-0,3	0.7
31	M	5,3	31,3	3,5	117	1,2	22,9	3,0	1,0
32	F	8,6	42	2	137	1,1	22,4	1,8	1,2
33	M	10,4	32,9	0	144	0,7	15,9	-0,5	1,2
34	M	3,3	19,3	2,1	103,5	1,5	18	1,6	0,7
35	M	3,2	20	2,7	109	2,8	16,8	0,7	0,8
36	F	11,4	57,5	1,7	159,5	1,7	22,6	1,3	1,6
37	F	11,5	27	-2	139,5	-1,2	13,9	-2,1	1,0
38	F	4,2	16	-2	103,5	-1,2	14,9	-2,1	0,7
39	F	3	15	0,4	97	0,8	15,9	0,1	0,6
40	F	3,3	12	-1,7	93	-0,9	13,9	-1,6	0,6

cm: centímetro, F: feminino, IMC: índice de massa corporal, Kg: quilograma, M: masculino, SC: superfície corporal, Z: Z escore, *: paciente com mutação no *SHOX*

Anexo D: Resultados de dosagens hormonais após suspensão da medicação por 4 semanas

Paciente	TSH (µUI/mL)	T4 (µg/dL)	T4L (ng/dL)	T3 (ng/dL)	TG (ng/mL)	Anti-TG (UI/mL)
1	227,4	ND	0,5	83	58,3	<35
2	15,2	9,8	1,1	207	45	<35
3	93,5	4,5	0,5	102	12,5	<35
4	25,5	9,1	1	165	74,2	<35
5	29	9,4	1,1	160	103	44
6	6	10,4	1,2	180	39	<35
7	41,3	7,6	0,9	102	4,5	<35
8	289,7	2,5	0,3	67	46,5	<35
9	0,2*	15,8*	2,7*	129	<1	<35
10	320,5	2,6	0,4	69	2,1	<35
11	41	10	1,1	197	69,6	<35
12	9,7	14,2	1,6	135	5,4	<35
13	251	2,1	0,4	49	103	<35
14	258,4	2,7	0,4	68	123	<35
15	315	<1,6	<0,3	46	9,1	<35
16	24	10,2	0,7	193	17,9	<35
17	247,9	4,2	0,5	115	27,5	<35
18	107,4	2,7	0,4	98	287	<35
19	300,9	<1,6	<0,3	14	<1	41
20	39,2	ND	1	184	1,6	101

Paciente	TSH (µUI/mL)	T4 (µg/dL)	T4L (ng/dL)	T3 (ng/dL)	TG (ng/mL)	Anti-TG (UI/mL)
21	260,7	1,8	0,3	46	18,7	<35
22	10	ND	1,1	186	70,2	<35
23	202,8	6,3	0,7	113	31,5	<35
24	181,6	<1,6	<0,3	40	250	<35
25	8,8	9,2	1	185	6,8	<35
26	2,1*	11	1,6	108	<1	<35
27	42	8,5	1	202	22,9	<35
28	187,9	1,6	0,3	39	4	<35
29	118,8	5,4	0,7	96	16,9	<35
30	301,5	<1,6	< 0,3	14	12,2	<35
31	46,9	11,1	1	193	53	<35
32	8,4	11,8	1,1	192	14,6	<35
33	63,3	ND	0,6	100	48,5	<35
34	8,5	10,1	1	217	89	<35
35	257,7	5,7	0,6	121	65,2	<35
36	12,1	ND	0,9	126	8,7	<35
37	117,5	2,6	0,4	14	76	<35
38	308,8	4,3	0,5	101	18,1	<35
39	80,7	ND	0,8	179	39,8	<35
40	240,5	ND	0,3	61	28,4	<35

* realizado em eutireoidismo, ND: não determinado

Anexo E: Valores de referência para volume normal de tireóide

Referência 1 – Valores de volume tireoidiano e medida dos lobos direito e esquerdo, de acordo com a estatura (Ueda, 1990) [51]

Estatura (cm)	**Volume (mL) ± DP**	**Medida do LD (cm)**	**Medida do LE (cm)**
-99	2,3 ± 0,7	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2
100-109	3,3 ± 1,0	0.8 ± 0,2	0.8 ± 0,2
110-119	4,1 ± 1,1	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2
120-129	4,9 ± 1,1	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2
130-139	6,3 ± 2,0	0,9 ± 0,3	1,0 ± 0,3
140-149	7,4 ± 2,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2
150-159	8,5 ± 2,3	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2
160-	10,9 ± 2,5	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,3

DP: desvio padrão, LD: lobo direito, LE: lobo esquerdo

Referência 2 – Valores de volume tireoidiano mínimo, máximo, média, desvio-padrão e intervalo de confiança para 95% de acordo com sexo e faixa etária (Duarte, 2004) [7]

Idade (anos)	**Meninos**						**Meninas**					
	Mín. mL	Máx. mL	M	DP	IC -95%	IC 95%	Mín. mL	Máx. mL	M	DP	IC -95%	IC 95%
6	1,6	4,9	3,2	1,2	2,1	4,2	2,3	5,2	3,7	0,8	3	4,4
7	1,7	6,7	3,6	1,2	3,3	4	2,2	7,8	3,8	1,2	3,4	4,2
8	1,6	7,8	4	1,2	3,7	4,5	2,2	6,5	3,9	0.9	3,7	4,2
9	1,8	9,2	4,5	1,3	4,1	4,8	2,9	10,8	4,6	1,1	4,3	4,9
10	1,9	9,2	4,7	1,2	4,4	5	3,1	9,4	5	1,1	4,7	5,3
11	1,9	8,2	5,2	1,3	4,9	5,6	3	15,4	5,9	2	5,4	6,4
12	2,5	13,9	6,1	1,9	5,6	6,5	4,3	17	6,9	1,9	6,4	7,4
13	3,2	13,4	7,2	2,4	6,6	7,8	4	14,4	7,2	1,9	6,7	7,7
14	3,1	3,1	7,4	2,4	6,8	8,1	3,5	18,3	7,7	1,9	7,2	8,2

DP: desvio-padrão, M: média, Máx.: valor máximo, Mín.: valor mínimo, mL: mililitro, IC: intervalo de confiança

Referência 3 – Valores de volume tireoidiano mínimo, máximo, média, desvio-padrão e intervalo de confiança para 95%, de acordo com sexo e superfície corporal (Duarte,2004) [7]

	Meninos						**Meninas**					
SC (m^2)	Mín. mL	Máx. mL	M	DP	IC -95%	IC 95%	Mín. mL	Máx. mL	M	DP	IC -95%	IC 95%
0,7	1,6	4,9	3	1,2	2,2	3,7	2,9	3,6	3,4	0,4	2,3	4,4
0,8	1,6	5,8	3,4	1	2,9	3,8	2,2	7,8	3,7	1,1	3,3	4,1
0,9	1,8	7,3	4,1	1,2	3,7	4,4	2,2	7,7	4,2	1	4	4,5
1	1,9	9,2	4,7	1,4	4,2	4,8	2,2	9,2	4,6	1,2	4,3	4,9
1,1	1,9	10,1	4,9	1,2	4,7	5,3	2,4	10,8	4,8	1,4	4,5	5,2
1,2	2,7	11,2	6	2	5,5	6,5	3,3	8,9	5,4	1,2	5,1	5,8
1,3	2,8	13,9	6,1	1,8	5,6	6,6	3,6	9,8	6,3	1,4	5,9	6,8
1,4	3	12,9	6,4	2,4	5,6	7,2	3,5	17	7,2	2,3	6,9	7,8
1,5	2,5	11,4	6,8	2,1	5,9	7,6	4,6	9,6	7	1,2	6,7	7,4
1,6	3,5	15	7,4	3,2	5,8	8,9	5,4	18,3	8,6	2,8	7,2	9,9
1,7	3,4	12,7	7,5	2,9	5,5	9,6	5,4	14,4	8,3	2,3	6,8	9,8
1,8	4,9	13,4	8	2,4	6,6	9,4	6,8	10,6	8,2	1,5	6,9	9,4

DP: desvio-padrão, M: média, Máx.: valor máximo, Mín.: valor mínimo, mL: mililitro, IC: intervalo de confiança, SC: superfície corporal

Anexo F: Medidas de lobos, istmo e volume tireoidianos de cada paciente estudado. Diagnóstico ultrassonográfico de acordo com referências.

N	LD	LE	Istmo	VT	Ref 1 (DP)	Ref 2 (DP)	Ref 3 (DP)	Diagnóstico
2	0,7	0,2	0,1	1	-2,8	ND	ND	Hipoplasia
5	1,3	0,6	0,2	2,1	-1,8	ND	ND	Normal
6	0,9	0,3	0,2	1,3	-1,4	ND	ND	Normal
10	3,2	2,8	0,8	6,8	3,5	ND	ND	Bócio
11	1,3	1,4	0,1	2,8	-0,5	ND	ND	Normal
16	0,4	0,2		0,6	-2,7	ND	ND	Hipoplasia
18	5,2	4,3	0,5	10	1,2	4	4,2	Bócio
20	1	0,5	0,2	1,8	-1,5	ND	ND	Normal
21				0,8	-3	ND	ND	Hipoplasia/Cisto
22	2,6	2,4		5,2	-1	0,5	-0,4	Normal
23	0,5	0,3		0,8	-3,7	ND	ND	Hipoplasia
24	1,5	1,7		2,8	-0,5	ND	ND	Normal

N	LD	LE	Istmo	VT	Ref 1 (DP)	Ref 2 (DP)	Ref 3 (DP)	Diagnóstico
25	1,3	1,4		2,5	-2,2	-1,5	-2	Hipoplasia
27	0,8	0,6		1,6	-2,3	ND	ND	Normal
31	1,2	0,7		1,9	-2	ND	ND	Normal
32	2,3	1,9		4,5	-0,9	0,67	-0,75	Normal
33	0,5	0,4		1	-2,9	-3	-2,5	Hipoplasia
34	1,1	1,2		2,6	-0,7	ND	ND	Normal
35	0,3	0,2		0,6	-2,7	ND	ND	Hipoplasia
36	1,3	1		2,4	-0,9	-1,75	-2,2	Normal
38				0,3	-3	ND	ND	Ectopia/hemiagenesia
39	3,3	2,6		6	5,2	ND	ND	Bócio

DP: desvio-padrão, LD: lobo direito, LE: lobo esquerdo, ND: não disponível, Ref: referência, VT: volume tireoidiano

Anexo G: Resultados de ultrassonografia com Doppler colorido, cintilografia, tireoglobulina sérica, teste do perclorato intravenoso, audiometria e diagnóstico combinado

N	USDC	RAIU	TG (ng/mL)	PCIV	Audio	Diagnóstico
1	Ectopia	Ectopia	58,3			Ectopia
2	Hipoplasia	Hipoplasia	45			Hipoplasia
3	Atireose	Ectopia	12,5			Ectopia
4	Ectopia	Ectopia	74,2			Ectopia
5	Normal	Normal hipercaptante	103 (ATG+)	NR	Normal	Defeito de *TPO/THOX2*
6	Normal	Normal	39			A esclarecer
7	Ectopia	Ectopia	4,5			Ectopia
8	Ectopia	Ectopia	46,5			Ectopia
9	Atireose	Atireose	<1			Atireose
10	Bócio	Bócio hipercaptante	2,1	Negativo	Normal	Defeito de *TG*
11	Normal	Normal hipercaptante	69,6	Positivo	Normal	Defeito de *TPO/THOX2*
12	Atireose	Atireose	5,4			Atireose
13	Atireose	Ectopia	103			Ectopia
14	Atireose	Ectopia	123			Ectopia

N	USDC	RAIU	TG(ng/mL)	PCIV	Audio	Diagnóstico
15	Atireose	Atireose	9,1			Atireose
16	Hipoplasia	Normal	17,9			Hipoplasia
17	Ectopia	Ectopia	27,5			Ectopia
18	Bócio	Bócio hipercaptante	287	Positivo	Normal	Defeito de *TPO/THOX2*
19	Atireose	Atireose	<1(ATG+)			Atireose
20	Normal	Normal hipercaptante	1,6(ATG+)	Positivo	Normal	Defeito de *TPO/THOX2*
21	Hipoplasia	Atireose	18,7			Hipoplasia
22	Normal	Normal hipercaptante	70,2	Positivo	Normal	Defeito de *TPO/THOX2*
23	Hipoplasia	Hipoplasia	31,5			Hipoplasia
24	Normal	Normal hipercaptante	250	Positivo	Normal	Defeito de *TPO/THOX2*
25	Hipoplasia	Normal	6,8			Hipoplasia
26	Atireose	Atireose	<1			Atireose
27	Hipoplasia	Hipoplasia	22,9			Hipoplasia
28	Atireose	Atireose	4			Atireose
29	Atireose	Ectopia	16,9			Ectopia

N	USDC	RAIU	TG(ng/mL)	PCIV	Audio	Diagnóstico
30	Ectopia	Ectopia	12,2			Ectopia
31	Normal	Normal hipercaptante	53	Negativo	Normal	Defeito de *TG*
32	Normal	Normal	14,6			A esclarecer
33	Hipoplasia	Hipoplasia	48,5			Hipoplasia
34	Normal	Normal hipercaptante	89	Positivo	Normal	Defeito de *TPO/THOX2*
35	Hipoplasia	Hipoplasia	65,2			Hipoplasia
36	Normal	Normal	8,7			A esclarecer
37	Ectopia	Ectopia	76			Ectopia
38	Ectopia/hemiagenesia	Ectopia	18,1			Ectopia
39	Bócio	Bócio hipercaptante	39,8	Negativo	Normal	Defeito de *TG*
40	Atireose	Ectopia	28,4			Ectopia

ATG: anti-tireoglobulina, audio: audiometria, N: paciente, NR: não realizado, PCIV: teste do perclorato, RAIU: captação, TG: tireoglobulina, USDC:ultrassonografia

Anexo H: Termo de consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE.:..... .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO:

BAIRRO: .....CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: .....CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **Pesquisa de mutações nos genes *PAX8* e receptor do TSH após a determinação da etiologia do hipotireoidismo congênito. Importância da ultrassonografia com Doppler colorido, cintilografia da tireóide e teste do perclorato intravenoso.**

PESQUISADOR: **Dra Cristine Barbosa Beltrão** .....

CARGO/FUNÇÃO: **Médica pós-graduanda**....INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº ...**101792**.

UNIDADE DO HCFMUSP: ..**Disciplina de Endocrinologia e Metabologia**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO xx☐ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 meses.....

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa: O hipotireoidismo que seu filho apresentou assim que ele nasceu precisa ser investigado depois que ele tiver 3 anos de idade. Assim não tem nenhum risco para o seu desenvolvimento, parar a medicação por 1 mês. Com esta pesquisa, conseguiremos saber por que seu filho tem hipotireoidismo. Se é porque a glândula não se desenvolveu completamente ou porque ela não funciona direito. A causa é genética, ou seja, o seu filho nasceu com esse problema. Precisaria saber se é de família ou só aconteceu com ele mesmo.

2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: O seu filho deve suspender o medicamento levotiroxina por 1 mês para fazer todos os exames. Ele vai colher exame de urina e de sangue, para analisar os hormônios e para o teste genético. O teste do perclorato de sódio vai precisar que seu filho receba uma medicação radioativa pela boca (iodo), que não dá nenhum problema porque a dose é muito baixa. Depois ele recebe uma medicação na veia (perclorato de sódio), que também não dá nenhum efeito ruim na criança. Depois ele ficará deitado em uma cama para uma máquina pequena fazer a leitura. Depois de uma semana, ele volta para o laboratório para fazer o exame da captação e mapeamento, quando ele toma de novo o iodo radioativo e tira umas fotos da tireóide. O exame de ultrassonografia vai ser feito na criança deitada e uma espécie de bastão é passado em todo o pescoço para procurar a tireóide e a imagem é vista em uma televisão.

3. desconfortos e riscos esperados: o desconforto da picada para injetar o perclorato. Nessa mesma hora, iremos colher os exames de sangue e do estudo genético. O perclorato e o iodo não dão nenhuma sensação ruim e duram poucas horas no corpo. Não há nenhum problema de passar para as outras pessoas, porque a dose é muito baixa.

4. benefícios que poderão ser obtidos: com estes testes, poderemos tentar encontrar a causa do hipotireoidismo do seu filho, dar o melhor tratamento e também aconselhar a família sobre o risco de ter outro filho com a mesma doença.

5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

_____

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

Os exames de sangue para este estudo não têm risco. Mesmo assim, todas as dúvidas serão esclarecidas a qualquer momento. Para esclarecimentos, a pessoa pode entrar em contato com o pesquisador responsável pelo projeto (item V).

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

O paciente e familiar que participar desta pesquisa pode desistir quando quiser, sem que isso implique em qualquer forma de constrangimento e não haverá nenhum prejuízo à sua assistência médica.

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

Os resultados dos exames serão entregues apenas aos responsáveis pelo paciente, não sendo divulgados para nenhuma outra pessoa. Toda a pesquisa terá sigilo absoluto. Os dados obtidos serão usados sem a identificação dos participantes.

4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

Caso haja qualquer dano à saúde, a Disciplina de Endocrinologia e Metabologia disponibilizará assistência ao paciente.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Não cabe indenização, porque o paciente receberá toda a assistência e não haverá prejuízo à sua assistência médica.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

_____

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 200... .

_____ _____

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal assinatura do pesquisador

Dra Cristine Barboza Beltrão

CRM 101792

Dra Suemi Marui

CRM 70248

(carimbo ou nome Legível)

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Larsen PR, Davies TF, Brent GA. Hypothyroidism and Thyroiditis. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS. Willians Textbook of Endocrinology. USA: Saunders; 2008. p.423-455.

2. Kempers MJE, Van Trotsenburg ASP, Van Rijn RR, Smets AMJB, Smit BJ, De Vijlder JJM, Vulsma T. Disturbance of the fetal thyroid hormone state has long-term consequences for treatment of thyroidal and central congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005; 90(7): 4094-100.

3. Van Vliet G. Development of the thyroid gland: lessons from congenitally hypothyroid mice and men. *Clin Genet*, 2003; 63:445-455.

4. Kratzsch J, Pulzer F. Thyroid gland development and defects. *Best Pract Res Clin Endocrinol and Metab*, 2008; 22: 57-75.

5. Fort PF, Brown RS. Thyroid disorders in infancy. In: Lifshitz F. Paediatric Endocrinology. New York: 2000. p.369-399.

6. LaFranchi S. Congenital hypothyroidism: etiologies, diagnosis, and management. *Thyroid*, 1999; 9(7): 735-40.

7. Duarte GC. Avaliação ultrassonográfica da tireóide, excreção urinária de iodo em escolares de 6 a 14 anos e grau de iodaçã do sal em diferentes regiões do estado de São Paulo [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2007.

8. Setian N. Tireóide. In: Setian N. Endocrinologia Pediátrica: aspectos físicos e metabólicos do recém-nascido ao adolescente. 2ª ed. São Paulo: Sarvier; 2002. p.253-313.

9. Castanet M, Polak M, Léger J. Linkage and mutational analysis of familial thyroid dysgenesis demonstrate genetic heterogeneity implicating novel genes. *Eur J Hum Genet*, 2005; 13(2): 232-9.

10. Medeiros-Neto G. Iodine deficiency disorders. *Thyroid*, 1990; 1(1): 73-82.

11. Park SM and Chatterjee VK. Genetics of congenital hypothyroidism. *J Med Genet,* 2005; 42(5): 379-89.

12. Devriendt K, Vanhole C, Matthjs G, De Zegher F. Deletion of thyroid transcription factor-1 gene in an infant with neonatal thyroid dysfunction and respiratory failure. *N Engl J Med*, 1998; 338(18): 1317-8.

13. Vono-Toniolo J, Kopp P. Thyroglobulin gene mutations and other genetic defects associated with congenital hypothyroidism. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2004: 48(1):70-82.

14. Perna MG, Civitareale D, De Filippis V, Sacco M, Cisternino C, Tassi V. Absence of mutations in the gene encoding thyroid transcription factor-1 (*TTF1*) in patients with thyroid dysgenesis. *Thyroid*, 1997; 7 3): 377-81.

15. Lapi P, Macchia PE, Chiovato L, Biffali E, Moschini L, Larizza D, Baserga M, Pinchera A, Fenzi G, Di Lauro R. Mutations in the gene encoding thyroid transcription factor-1 (*TTF1)* are not a frequent cause of congenital hypothyroidism (CH) with thyroid dysgenesis. *Thyroid*, 1997; 7(3): 383-7.

16. Medeiros-Neto G. Molecular biology of the genetic defects of synthesis, transport and peripheral action of the thyroid gland hormones. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*, 1990; 45(1): 29-37.

17. Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P, Crisp MS, John R, Lazarus JH, Ludgate M, Chaterjee VK. Mutation of the gene encoding human *TTF2* associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat Genet*, 1998; 19(4): 399-401.

18. Macchia PE, Mattei MG, Lapi P, Fenzi G, Di Lauro. Cloning, chromosomal localization and identification of polymorphisms in the human thyroid transcription factor 2 gene (*TTF2*). *Biochimie*, 1999; 81(5): 433-40.

19. Esperante SA, Rivolta CM, Miravallet L, Herzovicht V, Iorcansky S, Barallet M, Targonivk HM. Identification and characterization of four *PAX8* rare sequence variants (p. T225, p.L233L, p.G336D and

p.439A) in patients with congenital hypothyroidism and digenetic thyroid glands. *Clin Endocrinol*, 2007; 1-8.

20. Macchia PE, Lapi P, Krude H, Pirro MT, Missero C, Chiovato L, Soabni 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.

21. Tonacchera M, Banco MH, Montanellei L, Di Cosmo C, Agretti, P, De Marco G, Ferrarini E, Ordookhani A, Perri A, Chiovato L, Santini F, Vitti P, Pinchera A. Genetic analyses of the *PAX8* gene in children with congenital hypothyroidism and dysgenetic or eutopic thyroid glands: identification of a novel sequence variant. *Clin Endocrinol,* 2007; 67:34-40.

22. Krude H, Bieberman H, Göpel W, Grüters A. The gene for the thyrotropin receptor (*TSHR*) as a candidate gene for congenital hypothyroidism with thyroid dysgenesis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1996; 104 Suppl 4: 117-20.

23. MacGillivray MH. Congenital hypothyroidism. In: Pescovitz OH, Eugster EA. Pediatric Endocrinology: Mechanisms, Manifestations and Management. Indianapolis: Lippincott Willians & Wilkins; 2004. p.490-507.

24. Medeiros-Neto G, Knobel M. Genetic classification of inherited disorders of thyroid metabolism. *Thyroid*, 2003: 13(8): 771-801. 26.

25. Gagné N, Parma J, Vassart G, Van Vliet G. Apparent congenital athyreosis contrasting with normal plasma thyroglobulin levels and associated with inactivating mutations in the thyrotropin receptor gene: are athyreosis and ectopic thyroid distinct entities? *Clin Endocrinol*, 1998; 83 (5): 1771-5.

26. Perone D, Teixeira SS, Clara SA, Santos DC, Nogueira C. Aspectos genéticos do Hipotireoidismo Congênito. Arq Bras Endocrinol Metab, 2004; 48 (1): 62-69.

27. Levine, MA, Jap TS, and Hung W. Infantile hypothyroidism in two sibs: an unusual presentation of pseudohypoparathyroidism type Ia. *J Pediatr*, 1985; 107(6): 919-22.

28. Ordookhani A, *et al*. A high prevalence of consanguineous and severe congenital hypothyroidism in an Iranian population. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2004; 17(9): 1201-9.

29. Camargo R *et al*. Aggressive metastatic follicular thyroid carcinoma with anaplastic transformation arising from a long-standing goiter in a patient with Pendred's syndrome. *Thyroid*, 2001; 11(10): 981-8.

30. De la Vieja A, Ginter CS, Carrasco N. Molecular analysis of a congenital iodide transport defect: G543E impairs maturation and trafficking of the Na+/I- symporter. *Mol Endocrinol*, 2005; 19(11): 2847-58.

31. Glaser B. Pendred syndrome. *Pediatr Endocrinol Rev*, 2003;1 Suppl 2: 199-204; discussion 204.

32. Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, Van Trotsenburg AS, Baas V, De Vijlder JJ, Vulsma T, Ris-Stalpers C. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (*THOX2*) and congenital hypothyroidism. *New Eng J Med*, 2002; 347: 95-102.

33. Medeiros-Neto G, Kim PS, Yoo SE, Vono J, Targovink 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(12): 2838-44.

34. Knobel M, Medeiros-Neto G. Hipotireoidismo. In: WAJCHENBERG, BL. (Org.). Tratado de Endocrinologia. São Paulo: Roca, 1993, p. 308-329.

35. Pardo V, Rubio IGS, Knobel M, Aguiar-Oliveira MH, Santos MM, Oliveira C, Gomes S, Targonivk HM, Medeiros-Neto G. Phenotipic variation among four family members with congenital hypothyroidism caused by two distinct thyroglobulin gene mutations. *Thyroid*, 2008:18(7): 783-786.

36. Moreno JC, Kloot W, Gestel D, Goudie D, Polak M, Grueters A, Visser, T. *DEHAL1* gene mutations cause the iodotyrosinedehalogenase deficiency. in Proceedings of European

Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) / Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society (LWPES). 2005.

37. Price DA, Ehrlich RM, Walfish PG. Congenital Hypothyroidism. Cinical and laboratory characteristics in infants detected by neonatal screening. *Arch Dis Child*, 1981; 56: 845-851.

38. Lifshitz A, Laredo F, Romero E. Diagnostic strategies. *Gac Med Mex,* 1993; 129(3): 207-19.

39. Unachak K, Dejkhamron P. Primary congenital hypothyroidism: clinical characteristics and etiological study. *J Med Assoc Thai,* 2004; 87(6): 612-7.

40. Greenspan FS. The thyroid gland. In: Greenspan FS. Basic and Clinical Endocrinology. 6ª ed. United States of America: McGraw Hill Companies; 2001. p.201-242.

41. MacGillivray, MH. Paediatric Endocrinology: a practical clinical guideline. *New Jersey*, 2003; 479-521.

42. Borrajo GJC. Newborn screening in Latin America at the beginning of the 21st century. *J Inherit Metab Dis*, 2007; 30: 466-481.

43. Beltrão CB, Gomes CR, Gonçalves CG, Marui S. Incidência de hipotireoidismo congênito no serviço de triagem neonatal (STNN) de São Caetano - São Paulo - Brasil. In: XIX Reunión Anual de la Sociedad Latino-Americana de Endocrinología Pediátrica; 2007; Mar del Plata.

44. Brasil. Ministério da Saúde. *Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal.* Brasília: Ministério da Saúde; 2004.

45. Bastin, MJ. American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for clinical practice for the evaluation and treatment of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Endocrine Practice*, 2002; 8: 467-469.

46. Ueda D. Normal volume of the thyroid gland in children. *J Clin Ultrasound,* 1990; 18: 455-62.

47. Zimmermann MB, Hess SY, Molinari L, De Benoist B, Delange F, Braverman LE, Fujieda K, Ito Y, Jooste PL, Moosa K, Pearce EN, Pretell EA, Shishiba Y. New reference values for thyroid volume by ultrasound in iodine-sufficient schoolchildren: a World Health Organization/Nutrition for Health and Development Iodine Deficiency Study Group Report. *Am J Clin Nutr*, 2004; 79(2):231-7.

48. Svensson J, Nilsson PE, Olsson C, Nilsson JA, Lindberg B, Ivarsson SA Interpretation of normative thyroid volumes in children and adolescents: is there a need for a multivariate model? *Thyroid*, 2004; 14:536-43.

49. Chanoine JP, Toppet V, Lagasse R, Spehl M, Delange F. Determination of thyroid volume by ultrasound from the neonatal period to late adolescence, 1991; *Eur J Pediatr*, 1991; 150: 395-9.

50. Eugster EA, LeMay D, Zerin JM, Pescovitz OH. Definitive diagnosis in children with congenital hypothyroidism. *J Pediatr*, 2004; 144(5): 643-7.

51. Scinicariello F, Murray EH, Smith L, Wilbur S, Fowler BA. Genetic factors that might lead to different responses in individuals exposed to perchlorate. *Environ Health Perspect*, 2005; 113: 1479-1484.

52. Baschieri, Benedetti G, DeLuca F, Negri M. Evaluation and Limitations of the Perchlorate Test in the Study of Thyroid Function. *J Clin Endocrinol Metab*, 1963; 23: 786-91.

53. Wolff J, Perchlorate and the thyroid gland. *Pharmacol Rev*, 1998; 50 (1): 89-105.

54. Vulsma T. Etiology and pathogenesis of congenital hypothyroidism. In: University of Amsterdam; 1991: Amsterdam.

55. Ohnishi H, Sato H, Hiromasa N, Inomata H, Sasaki N. Color Doppler ultrasonography: diagnosis of ectopic thyroid gland in patients with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003; 88(11): 5145-5149.

56. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1988; 16: 1215.

57. Abrão MG, Billerbeck AE, Nishi MY, Marui S, Mendonça BB. Standardization of DNA extraction with NaCl from oral mucosa cells:

application in *PROP1* gene study. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2005; 49(6): 978-82.

58. Mathai S, Cutfield WS, Gunn AJ, Webster D, Jefferies C, Robinson E, Hofman P. A novel therapeutic paradigm to treat congenital hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxford),* 2008; 69(1):142-7.

59. Sobrero G, Muñoz L, Bazzara L, Martin S, Silvano L, Iorkansky S, Bergoglio L, Spencer C, Miras M. Thyroglobulin reference values in a paediatric infant population. *Thyroid*, 2007; 17(11): 1049-1054.

60. Mazzaferri EL, Robbins RJ, Spencer CA, Braverman LE, Pacini F, Wartofsky L, Haugen BR, Sherman SI, Cooper DS, Braunstein GD, Lee S, Davies TF, Arafah BM, Ladenson PW, Pinchera A. A consensus report of the role of serum thyroglobulin as a monitoring method for low-risk patients with papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003; 88 (4): 1433-41.

61. Baloch Z, Carayon P, Conte-Devolx B, Demers LM, Feldt-Rasmussen U, Henry JF, LiVosli VA, Niccoli-Sire P, John R, Ruf J, Smyth PP, Spencer CA, Stockigt JR. Guidelines Comitee, National Academy of Clinical Biochemistry. *Thyroid*, 2003 Jan;13(1):3-126.

62. Naik KS, Bury RF. Review Imaging the Thyroid. *Clin Radiol*, 1998;53: 630-639.

63. Muzza M, Persani L, Filippis T, Gastaldi R, Vigone MC, Sala D, Weber G, Lorini R, Beck-Peccoz P, Fugazzola L. Absence of sonic hedgehog

(Shh) germline mutations in patients with thyroid dysgenesis. *Clin Endocrinol,* 2008; 69 (5): 828-829.

64. Perone D. Avaliação do envolvimento dos genes *PAX8* e *TSHR* no hipotireoidismo congênito em pacientes com disgenesia tireoidiana [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2004.

65. Iorcansky S, Herzovich V, Qualey R, Tutle RM. Serum thyrotropin levels after recombinant human TSH injections in children and teenagers with papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005; 90 (12): 6553-6555.

66. Fugazzola L, Personi L, Mannavela D, Reschinit E, Vannucchi G, Webert G, Beck-Peccoz P. Recombinat human TSH testing is a valuable tool for differential diagnosis of congenital hypothyroidism during L-thyroxine replacement. *Clin Endocrinol*, 2003; 59: 230-236.

67. Moreno-Reyes R, Tang B, Seret A, Goldman S, Daumerie C, Corvilain. Impaired iodide organification in autonomous thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007; 92(12): 4719-4724.

68. Gordon B, Yaakob W, Willi S, Buse M, Gordon L. Congenital thyroid disease revisited: migrational anomalies and dyshormonogenesis. *J Nucl Med Technol*, 1999; 27(4): 282-286.

69. Perry RJ, Maroo S, Maclennan AC, Jones JH, Donaldson MDC. Combined ultrasound and isotope scanning is more informative in the

diagnosis of congenital hypothyroidism than single scanning. *Arch Dis Child*, 2006; 91: 972-976.

70. Cavarzere P, Castanet M, Polak M, Raux-Demay MC, Cabrol S, Carel JC, Léger J. Clinical description of infants with congenital hypothyroidism and iodide organification defects. *Horm Res,* 2008; 70:240-248.

71. Kreisner E, Camargo-Neto E, Maia CR, Gross JL. Accuracy of ultrasonography to establish the diagnosis and aetiology of permanent primary congenital hypothyroidism. *Clin Endocrinol(Oxford)*, 2003; 59: 361-365.

72. Camilot M, Teofoli F, Vincenzi M, Federic F, Perlini S, Tatò L. Implementation of a congenital hypothyroidism newborn screening procedure with mutation detection on genomic DNA extracted from blood spots: the experience of the italian northeastern reference center. *Genet Test*, 2007; 11(4): 387-390.

73. Narumi S, Muroya K, Abe Y, Yasui M, Asakura M, Hasegawa T. TSHR mutations as a cause of congenital hypothyroidism in Japan: a population-based genetic epidemioloy study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009;1-13.

74. 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(8): 3962-3967.

75. Camilot M, Teofoli F, Gandini A, Franceschi R, Rapa A, Corrias A, Bona G, Radetti G, Tatò L .Thyrotropin receptor gene mutations and TSH resistance: variable expressivity in the heterozygotes. *Clin Endocrinol* (Oxf), 2005; 63(2) 146-51.