Solange Caires Neves

Hipotireoidismo congênito: rastreamento
e identificação de mutações no gene
TPO em pacientes com defeito parcial ou
total de incorporação de iodeto

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

Área de concentração: Endocrinologia
Orientadora: Dra. Ileana Gabriela Sanchez de
Rubio

São Paulo
2008

Dedico esta dissertação ao Prof. Dr Geraldo – Medeiros Neto

Por mais que procure não consigo encontrar palavras para expressar todo meu respeito, admiração, afeto e gratidão.

Dr, obrigada... por tudo. Principalmente por acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

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

A Deus, por sua infinita generosidade; por ter me dado saúde, sorte e determinação para alcançar meu objetivo.

À Dra Ileana, minha orientadora e querida amiga (Ilê), com quem tive o privilégio de conviver profissionalmente e particularmente todos esses anos. Obrigada por me receber de braços abertos quando cheguei insegura e totalmente alheia ao mundo da biologia molecular. Pela orientação segura, pela paciência com meus erros e teimosia; e pelo entusiasmo com os meus acertos. Tenho certeza que sem você por perto, me orientando e auxiliando, seria impossível realizar este trabalho.

As duas pessoas mais importantes da minha vida, minha mãe (o ser humano mais generoso e paciente que conheço) e minha irmã (que com seu jeito brincalhão e despretensioso me ensina todos os dias que o essencial à vida não está no material), obrigada por tudo que vocês fizeram e fazem por mim até hoje. Obrigada pelas palavras de incentivo, apoio, carinho, e principalmente pelo amor incondicional de vocês.

A minha “irmã de alma” ALEXANDRA PAPASSÍDERO, (quem a vida se encarregou de nos unir mesmo antes de nos conhecermos), obrigada pelo incentivo, apoio, disponibilidade, lealdade e principalmente por seu exemplo de dedicação à família, ao trabalho e as amigos. Sem você Ale tudo seria muito mais difícil e bem menos comemorativo.

Aos meus queridos familiares, pela certeza de estarem comigo em todos os momentos.

As minhas queridas amigas e companheiras de um momento único de nossas vidas, onde dividimos os mesmos sonhos, medos e expectativas: Viviane, Roberta, Ana Luiza, Paola, Kátia e Maria do Socorro. Obrigada por toda ajuda, apoio e incentivo. E principalmente, muito obrigada “meninas da tireóide” por todos os momentos divertidíssimos e inesquecíveis que passamos juntas. E a você Érica que chegou agora, boa sorte!

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

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

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

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

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

À Maria Silvia Cardia, Jacira e Amélia pela ajuda quando solicitada.

À FAPESP e ao Indatir pelo apoio financeiro.

“Um dia você aprende que realmente é forte e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. Descobre que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida! Aprende que nossas dúvidas são traiçoeiras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar”.

William Shakespeare, 1564- 1616

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO	1
Fisiologia da tireoide	1
Hormônios tireoideanos	2
Biossíntese dos hormônios tireoideanos	3
Hipotireoidismo congênito	6
A era da detecção Neonatal	8
Diagnóstico etiológico do HC	9
Defeitos genéticos da organogênese da tireóide	12
Defeitos genéticos da síntese hormonal	13
A tireoperoxidase e sua síntese	13
Biologia molecular e estrutura da TPO	14
Mutações no gene TPO em humanos	16
Defeitos na geração de Peróxido de Hidrogênio e o gene DUOX2	18
2. OBJETIVOS	20
3. CASUÍSTICA	22
Pacientes	21
4. METODOLOGIA	25
Avaliação da função tireóidea	25
Teste de perclorato	25
Extração de DNA	26
Quantificação de DNA	26
Amplificação do gene TPO por Reação de Polimerase em Cadeia	26
Amplificação do gene DUOX2	29
Eletroforese em gel de gradiente denaturante (DGGE)	31
Purificação dos produtos de PCR	32
Seqüenciamento	32
Clonagem de fragmentos de PCR	33
Alinhamento da sequência proteica	33
Análise da estrutura secundária da proteína mutada	34
5. RESULTADOS	35

Alterações genéticas no gene TPO	35
Pacientes com defeito total de incorporação de iodeto.....	37
Pacientes com defeito parcial de incorporação de iodeto.....	49
Análise das novas alterações nos controles.....	66
Alinhamento da sequência de aminoácidos da TPO.....	66
Análise da estrutura secundária da proteína in silico.....	69
6. DISCUSSÃO.....	70
Mutações no gene TPO.....	70
Frequência das mutações no gene TPO.....	75
Mutações monoalélicas e bialélicas no gene TPO.....	76
As mutações do gene TPO nas famílias.....	78
7. CONCLUSÕES.....	79
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

a.v.h: volts acumulados / hora

CCP: Proteína de controle complementar

CcP: Citocromo *c* oxidase

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar ao mRNA

cm centímetros

DIT: Diiodotirosina

DGGE: Eletroforese em gel de gradiente denaturante

DMSO: Dimetilsulfoxido

DNA: Ácido desoxirribonúcleico

EGF: Factor de crescimento epidermal

EPO: Peroxidase eosinófila

HC: hipotireoidismo congénito

HTs: Hormonas da tiróide

hTPO: Peroxidase da tiróide humana

LPO: Lactoperoxidase

MIT: Monoiodotirosina

MPO: Mieloperoxidase

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

NIS: Transportador sódio –iodo, Na⁺/I⁻ Simporte

dNTP: Trifosfato desoxinucleotídeo

PCR: Reacção em cadeia da polimerase

r.c.f: Força centrífuga do rotor

rT3: Triiodotironina reversa

s: segundo

SNPs: Polimorfismos de variação de um único nucleotídeo

SPO: Peroxidase salivar

T3: Triiodotironina

T4: Tetraiodotironina ou Tiroxina

TG: Gene da tiroglobulina

TGB: Globulina ligadora da tiroxina

TPO: Peroxidase da tiróide

TRH: Hormônio libertadora da tirotropina

TSH: Hormônio estimuladora da tiróide

TTF-1: Fator de transcrição tireóideo 1

TTF-2: Fator de transcrição tireóideo 2

Os aminoácidos serão citados pelo código de uma letra

RESUMO

Neves, SC. Hipotireoidismo Congênito: rastreamento e identificação de mutações no gene TPO em pacientes com defeito parcial ou total (dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Introdução: O hipotireoidismo congênito é a causa mais frequente de retardo mental evitável, cuja prevalência é de 1/3000 crianças nascidas vivas. Pode ser causado por disgenesia tireoideana (80% dos casos) ou por defeitos de síntese hormonal (20% restantes). As disormonogêneses tem sido associadas a mutações nos genes da tireoperoxidase (TPO), tireoglobulina, *dual oxidase 2*, pendrina, desalogenase e do simportador sódio/iodo. A tireoperoxidase (TPO) é uma glicoproteína de 105 KDa, localizada na membrana apical do tireócito, responsável pela organificação do iodeto. Até o momento 54 mutações, associadas ao hipotireoidismo congênito foram identificadas no gene TPO. **Objetivos:** Este estudo visou rastrear mutações no gene TPO em pacientes com hipotireoidismo congênito, com defeito total ou parcial de incorporação de iodeto, e associar o defeito genético com o fenótipo do paciente. **Casuística e Métodos:** Foram estudados 34 pacientes com hipotireoidismo congênito, 13 com DIIT (descarga de iodeto >50%) e 21 com DIIP (descarga de iodeto entre 25 e 50%) por possível defeito no gene TPO. Os métodos empregados foram: extração do DNA genômico de sangue periférico, amplificação por PCR do promotor e dos 17 exons do gene TPO e dos 33 exons do gene DUOX2, eletroforese em gel de gradiente denaturante (DGGE) e seqüenciamento. **Resultados:** Foram identificadas 8 novas alterações de seqüências que levam a troca de aminoácidos: Leu68Ile, Gly319Glu, Ala426Gly, Arg584Gln, Val618Met, Pro883Leu, Ala909Thr, A909fsX49; e 4 já descritas na literatura: 396fsX76, Gln660Gly, Arg665Trp, Cys838Ser. Dois pacientes com DTII apresentaram mutações em homozigose, e dois pacientes (um com DTII e um com DPII) eram portadores de alterações em heterozigose composta. Seis pacientes eram portadores de um único alelo da TPO afetado (três com DPII e três com DTII). Foram identificados também 33 polimorfismos (10 novos). Apenas polimorfismos foram identifiados no gene DUOX2. **Conclusão:** Foi verificada alta freqüência de mutações monoalélicas em pacientes com DIIT e DIIP. Em ambos os grupos as mutações se localizaram ao longo de todo o gene, tanto no domínio extracelular como no intracelular da proteína. Somente duas mutações foram identificadas em mais de um paciente, mostrando a heterogeneidade genotípica da doença nesta população.

Descritores: Hipotireoidismo Congênito, criança, iodeto peroxidase, mutação genética, análise de seqüência de DNA

SUMMARY

Neves CS. Screening and identification of TPO gene mutations in patients with partial or total iodide organification defect [dissertation]. School of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2008.

Introduction: Congenital Hypothyroidism affects 1/3000 birth, is caused by thyroid gland dysgenesis (80%) or inborn errors of the thyroid hormone biosynthesis (20%). Genetics defects of the genes for thyroid peroxidase, (TPO), thyroglobulin, sodium/iodine symporter, dual oxidase 2, and pendrin have been associated to dysmorphogenesis. TPO is a glycoprotein of 105 KDa situated in the apical membrane of the thyroid cell, responsible for iodide organification. At least 54 mutations have been identified in patients with dysmorphogenesis. **Objectives:** The aim of the study was to identify TPO gene mutations in patients with congenital hypothyroidism with total (DIIT) and partial (DIIP) iodide organification defects and to associate the genetic defect with the phenotype of the patient. **Patients and Methods:** Thirty four patients with congenital hypothyroidism, 13 with DIIT (iodide discharge >50%) and 21 patients with DIIP (iodide discharge between 25-50%) due to possible TPO gene defect. Extraction of genomic DNA from peripheral blood, PCR amplification of the promoter, 17 exons of TPO gene and of the 33 exons of DUOX2 gene, denaturant gradient gel electrophoreses (DGGE) and sequencing were performed. **Results:** Eight new sequence alterations were identified: Leu68Ile, Gly319Glu, Ala426Gly, Arg584Gln, Val618Met, Pro883Leu, Ala909Thr, A909fsX49; and four previously described mutations: 396fsX76, Gln660Gly, Arg665Trp, Cys838Ser. Homozygous mutations were identified in two patients with DTII. Two patients (one with DTII and one with DPII) were carrying compound heterozygous mutations. TPO monoallelic mutations were identified in six patients (3 with DPII and 3 with DTII). Thirty three polymorphisms had also been identified (10 new). **Conclusion:** High frequency of TPO monoallelic mutations was detected in patients with DIIT and DIIP. In both groups of patients the mutations were located all throughout the gene, in the extracellular as well as in the intracellular domain. Only two mutations have been identified in more than one patient, indicating the genotypic heterogeneity of the illness in this population.

Descriptors: Congenital Hypothyroidism, child, peroxidase iodide, genetic mutation, analysis of DNA sequence.

1- INTRODUÇÃO

Fisiologia da tireóide

A tireóide foi descrita inicialmente por Galeno, mas apenas recebeu esta denominação em 1656 quando Thomas Wharton escreveu uma monografia sobre glândulas. A palavra tireóide é derivada do grego e significa "semelhante a um escudo". A sua função não era conhecida até o final do século XIX, quando baseado em observação de tireoidectomias experimentais e casos clínicos foi constatada a sua importância na compreensão de doenças como cretinismo e mixedema. Em 1891 foi relatada a primeira terapia hormonal bem sucedida com extratos não purificados de tireóide (Moore *et al.*, 2004).

A tireóide é a primeira glândula endócrina que surge durante o desenvolvimento embrionário. Evolui a partir de espessamento endodérmico (divertículo tireoideano), mediano no assoalho da faringe primitiva que migra caudalmente e posiciona-se em situação cervical final por volta da sétima semana de gestação. A tireóide se origina de duas estruturas embrionárias diferentes, que darão origem as células foliculares e as células parafoliculares produtoras de calcitonina (Células C). Após a migração, ocorre diferenciação das células foliculares e a fusão das duas populações celulares (Knobel *et al.*, 2001; Kopp, 2002, De Felice e Di Lauro, 2004). A síntese dos hormônios tireoideanos ocorre somente nos folículos em desenvolvimento, confirmando a interação direta da maturação estrutural e

funcional da tireóide durante a diferenciação (Szinnai *et al.*, 2007). Evidências correntes sugerem que os fatores de transcrição: fator de transcrição tireoideano 1 (TTF-1, NKX-2 ou T/EBP); fator de transcrição tireoideano 2 (TTF-2, FOXE-1 ou FKLH-15); 3) *paired Box transcription factor 8* (PAX-8) são indispensáveis à evolução glandular (Amendola *et al.*, 2005). Estes se expressam preferencialmente nos tireócitos e interagem com promotores da tireoglobulina (TG), tireoperoxidase (TPO) e receptor de TSH (TSHR) modulando a expressão de genes tireoideanos específicos (Knobel e Medeiros-Neto, 2003).

Hormônios tireoideanos

A principal função dos hormônios tireoideanos (HTs) é a regulação do consumo energético, sendo indispensáveis para o crescimento, desenvolvimento e manutenção dos mamíferos. Entre outras funções desses hormônios incluem-se o estímulo da frequência e da força da contração cardíaca, da síntese protéica e do metabolismo glicídico, o aumento de síntese e degradação do colesterol e triglicérides, o aumento das necessidades vitamínicas, a potencialização da sensibilidade dos receptores β -adrenenérgicos às catecolaminas (Whitley *et al.* 1996), a elevação da síntese de ATP mitocondrial (Verhoeven *et al.*, 1985), além de possuir efeitos sobre o peso corporal e metabolismo de gorduras (Lomenick *et al.*, 2008). Outras funções não genômicas dos hormônios tireoidianos incluem a modulação de concentração intracelulares de Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , o transporte de glicose, a ativação da PKC proteína quinase C (PKC), da proteína quinase A

(PKA), da quinase regulada por sinais extracelulares (ERK) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e respectivamente a regulação do metabolismo fosfolipídico pela ativação das fosfolipases C e D (Kavok *et al.*, 2001). Os hormônios tireoidianos desempenham, ainda, um papel fundamental no crescimento axonal, formação de sinapses, mielinização, proliferação e migração neuronal (Moura Neto *et al.*, 1996).

Biossíntese dos hormônios tireoideanos

O iodo (I) é o elemento principal na síntese dos hormônios da tireóide, é proveniente da dieta, absorvido no trato gastro-intestinal e captado pela tireóide a partir da corrente sangüínea (Dohan *et al.*, 2003).

Na hormonogênese o iodeto, a forma com que o iodo entra na glândula da tireóide, tem que ser primeiro oxidado para um estado mais elevado antes que consiga atuar como um agente ionizante.

A síntese se inicia com o transporte ativo do substrato iodeto através da membrana basolateral da célula folicular, por intermédio do simportador de sódio e iodeto (Na^+/I^- ou NIS) (De La Vieja *et al.*, 2000) (Figura 1). A pendrina (PDS), transportador aniônico assim como o transportador apical humano (hAIT), permitem o transporte de iodeto para o colóide através da membrana apical (Everett *et al.*, 1999; Koop *et al.*, 2000, Rodriguez *et al.*, 2002). Na face luminal da membrana, a tireoperoxidase (TPO), na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado pelo sistema DUOX (De Deken *et al.*, 2000), oxida o iodeto e, subsequente, liga o iodo a resíduos tirosil da tireoglobulina intrafolicular (incorporação de iodeto). As iodotirosinas,

também por ação da TPO, são conjugadas para formar moniodotirosina (MIT) e didiotirosina (DIT). Uma molécula de DIT e uma de MIT ligam-se para formar T3 (triiodo) e duas de DIT ligam-se para formar T4(tetraiodo). A liberação destes hormônios ocorre após a digestão da TG (Taurog, 2000). As iodotirosinas não utilizadas na síntese dos hormônios são deiodadas pela enzima desalogenase (DEHAL), dentro da tireóide (Gnidehou *et al.*, 2004). O iodo liberado é reutilizado e apenas pequena proporção da TG não hidrolisada entra na circulação sanguínea (Trotta, 1991).

A proporção de T4 e T3 formados depende da quantidade de iodo disponível e, portanto, da extensão da iodação da TG. O excesso de iodo exerce geralmente um efeito inibitório, levando a um bloqueio do mecanismo de ionização, através da diminuição de produção de H_2O_2 (efeito Wolff-Chaikoff), inibindo a síntese dos hormônios (Wolff e Chaikoff, 1944) Braverman e Ingbar (1963) propuseram que o escape do efeito Woff-Chaikoff agudo se deve à diminuição no transporte de iodo que leva a sua baixa concentração intracelular, removendo a inibição da organificação.

Figura 1: Síntese e secreção dos hormônios tireoidianos. (1) Captação do iodeto (I^-) pela célula folicular através do co-transportador Na^+/I^- (NIS). (2) Síntese da tireoglobulina (TG) no retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi. (3) Transporte da TG sintetizada para a superfície apical em pequenas vesículas. (4) Iodinação da TG e ligação dos precursores iodotirosina (MIT, DIT) para a formação de T_4 e T_3 , mediada pela tireoperoxidase (TPO) na presença de H_2O_2 , sintetizada pelo sistema DUOX (5) Captação da TG por micropinocitose, passando pelos endossomos e lisossomos (L), onde ocorre a proteólise e secreção hormonal. (7) Liberação do T_4 e T_3 para a corrente sangüínea. (8) Monodesiodação do T_4 em T_3 na célula folicular e secreção do T_3 para a corrente sangüínea. (9) Recirculação do I^- liberado pelo MIT e DIT.

Em condições normais, a tireóide forma mais T_4 do que T_3 , geralmente em proporção de 10:1 a 20:15. A totalidade do T_4 circulante provém da tireóide, enquanto apenas 10% a 30% do T_3 são de origem glandular. A maior parte do T_3 circulante resulta da transformação do T_4 , através das enzimas desiodases tipos I, II e III (Trotta, 1991; Cavalieri, 1997). A desiodase tipo I é encontrada principalmente no fígado, rins e tireóide, sendo sua função a catalisação do T_4 para T_3 , bem como do T_4 para T_3 reverso e, principalmente, deste último para T_2 . A desiodase tipo II é encontrada na tireóide, cérebro, hipófise anterior, gordura marrom, coração, músculo esquelético e placenta, e promove a catalisação do T_4 para T_3 . A desiodase tipo III é encontrada no cérebro, pele, intestino, útero e placenta, e transforma T_4 em T_3 reverso, assim como T_3 em T_2 (Burrow *et al.*, 1994; Kok *et al.*, 2001).

Uma vez liberados pela glândula tireóide, os hormônios ligam-se às proteínas plasmáticas transportadoras TBG, pré-albumina (TBPA) e albumina, que servem como tampões, reservatórios e distribuidores para os tecidos, sendo que apenas 0,03% a 0,05% do T4 e 0,5% do T3 são encontrados em forma livre no sangue. A TBG transporta 80% do T4 e 90% do T3, a TBPA liga-se a 15-20% do T4 e de 1% a 5% do T3; e a albumina transporta 5% a 10% do T4 e 5% a 30% do T3. Os hormônios tireoidianos apresentam ligação diversa com as proteínas plasmáticas, o que determina a distribuição nos compartimentos intra e extravascular. O T4 é encontrado principalmente no intravascular e o T3 no intracelular (Fisher, 1998).

Os hormônios da tireóide são excretados sob forma livre ou como conjugados glucorônicos ou sulfurônicos, pela urina e pelas fezes. (Fisher, 1990).

Hipotireoidismo Congênito

O hipotireoidismo congênito (HC) é a causa mais comum de retardo mental evitável nas crianças (Gruters, 1992). Na maioria das vezes a causa não é hereditária, impossibilitando a identificação da população de mulheres com gravidez de alto risco. A incidência do HC, em países com aporte suficiente de iodo, varia de 1:2000 a 1:3000 nascidos vivos (Deladoey *et al.*, 2007). Nos últimos anos a incidência do HC vem aumentando devido à diminuição dos valores de corte do TSH empregado na detecção da doença (Loeber, 2007).

Estudos mostram que a incidência do HC pode variar dependendo de etnias, presença de consangüinidade ou área geográfica. A freqüência é maior em neonatos brancos do que em neonatos negros sendo de três a quatro vezes mais freqüentes no sexo feminino comparativamente ao masculino. (La Franchi, 1999)

O HC pode ser classificado em 4 grupos principais: hipotireoidismo permanente esporádico, permanente primário, permanente hipotalâmico-hipofisário, e transitório (Foley, 2000). (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação do Hipotireoidismo Congênito (adaptado de Foley, 2000)

Hipotireoidismo permanente	
Esporádico	Primário
Disgenesia da tireóide;	Perda da função do receptor da TSH
Agenesia	(resistência ao TSH)
Ectopia	Dishormonogênese
Hipoplasia	Defeitos no transporte de iodo (I ⁻)
Exposição materna ao iodo radioativo	Defeito na peroxidase da tireóide
Toxoplasmose congênita	Defeito na síntese da Tg
Defeitos genéticos na embriogênese	Defeito na desidases das iodotirosinas
Hipotireoidismos permanente Hipotálamo-Pituitário	
Múltiplas deficiências nos hormônios hipotalâmicos	
Idiopático	
Familiar	
Associado a defeitos anatômicos do Sistema Nervoso Central	
Deficiência no TRH	
Deficiência no TSH	
Mutação na subunidade β da TSH com perda de função	
Hipotireoidismo transitório	
Falta de Iodo (I ⁻)	
Exposição materna ou neonatal ao iodo (I ⁻)	
Terapia materna com drogas antitireóideas	
Anticorpos maternos bloqueadores no receptor da TSH	
Dishormonogênese transitória	
Defeito oxidativo	
Nefrose congênita	
Concentração elevada de TSH idiopática	
Isolado	
Síndrome de Down	
Hipotireoidismo primário idiopático	

A Era da detecção Neonatal

Os primeiros programas de detecção neonatal de hipotireoidismo foram desenvolvidos em Quebec e Pittsburg, em 1974 (Dussault *et al.*, 2004). No Brasil destaca-se o pioneirismo da Associação de Pais para Apoio ao Excepcional (APAE) de São Paulo, em 1978 sob supervisão do Prof Benjamin Schimidt (Medeiros-Neto, 2004). Entretanto, apenas em 2001, foi estabelecido o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) pelo Ministério da Saúde, organizando o serviço prestado pelo Sistema Único de Saúde e oferecendo gratuitamente a realização do exame, assim como o acompanhamento e tratamento das doenças diagnosticadas (Ministério da Saúde. Portaria nº. 822, 6 de julho de 2001) (Carvalho *et al.*, 2007). Esses programas de detecção tornaram-se possíveis graças à aplicação de técnicas de radioimunoensaio para dosagem dos hormônios tireoideanos e TSH em sangue obtido por punção de calcanhar e colhido em papel de filtro.

Quanto mais cedo se estabelece o diagnóstico do HC e se inicia a terapia de reposição do hormônio tireoideano (HT), maiores são as possibilidades de evitar danos neurológicos nas crianças afetadas (Klein, 1972). Qualquer que seja a etiologia do HC o tratamento consiste na terapia de reposição com tiroxina sintética (levotiroxina ou L-tiroxina), para manutenção dos concentrações séricas da tiroxina em valores normais, o que permite um desenvolvimento psicomotor normal do paciente (Osório *et al.*, 1999).

Estudos realizados antes do desenvolvimento dos programas de detecção mostram uma clara relação inversa entre a idade na ocasião do

diagnóstico clínico, início do tratamento e o coeficiente intelectual (QI). Adicionalmente a um QI reduzido, outras seqüelas neurológicas estão associadas ao hipotireoidismo congênito como: incordenação motora fina e grosseira, ataxia, hipotonia, hipertonia, dificuldade de concentração, dificuldades na fala, perda auditiva sensório-neural, estrabismo. (Kfein *et al.*, 1972).

Ao nascimento, as manifestações clínicas do hipotireoidismo são freqüentemente inespecíficas, sutis ou ausentes, de tal maneira que menos de 5% das crianças diagnosticadas pelos programas são suspeitas de apresentarem a doença com base em achados clínicos. Os recém nascidos mais severamente afetados com os menores concentração de tiroxina podem apresentar os sinais e sintomas clássicos de hipotireoidismo, que incluem icterícia prolongada, problemas de alimentação, constipação, cutis marmorata, hérnia umbilical, macroglossia, aumento na fontanela posterior e hipotonia. (La Franchi *et al.*, 1979).

Em resumo, os programas de detecção neonatal de hipotireoidismo congênito é um sucesso, podendo ser considerado um marco no diagnóstico do HC.

Diagnóstico etiológico do Hipotireodismo Congênito

Para avaliação diagnóstica, são realizados exames de imagens da tireóide (ultrassonografia e cintilografia) que permitem determinar a localização e desenvolvimento da glândula e, conseqüentemente, a etiologia e prognóstico da doença (Delangue e Czernichow, 1990). Na presença de

uma tireóide corretamente formada e localizada, independentemente do tamanho, suspeita-se de HC por defeito em um dos passos da hormonogênese. Alterações na localização ou na morfologia da glândula são indicativos de disgenesia tireoideana (DT).

O teste de perclorato juntamente com os testes bioquímicos confirmatórios são efetuados quando a criança atinge os três anos de idade, uma vez que para a realização dos exames é necessário suspender o tratamento durante quatro semanas. Nesta idade, a suspensão do tratamento já não afeta o seu desenvolvimento cerebral.

Em geral, o aporte radioiodo para a glândula é em função da quantidade de tecido existente e do nível de estimulação pelo TSH (De Vijlder e Vulsma, 2000). Baixos valores de captação do radio iodo podem apontar para problemas no transporte do iodo (defeitos de NIS ou pendrina, (Pholenz *et al.*, 1998; Everett *et al.*, 1997). No caso de defeitos no transportador NIS, os pacientes apresentam uma razão de [I-] saliva/plasma muito baixa que funciona como diagnóstico diferencial. Captação rápida de radioiodo é observado em defeitos de oxidação e ionização, que incluem defeitos de TPO, do sistema DUOX, da síntese TG e reciclagem do iodo (De Vijlder, 2003). Pacientes com defeitos na síntese de TG apresentam baixos concentração de TG sérica em relação aos concentração de TSH e não se elevam após o estímulo com TSH humano recombinante (Pardo *et al.*, 2008). Pacientes com defeitos de TPO ou do sistema DUOX apresentam elevados concentração de TSH concomitantemente com elevados níveis de TG (Nascimento *et al.*, 2004, Moreno *et al.*, 2002). Nos defeitos de

reciclagem de iodo (defeito de DEHAL) o diagnóstico só pode ser estabelecido baseado na presença de iodotironinas na urina. A perda de iodo através da excreção urinária de tirosinas iodadas diminui a disponibilidade do halogênio para a formação de mais hormônios (Moreno *et al.*, 2008).

Os resultados dos estudos bioquímicos e de imagens são extremamente importantes porque podem direcionar os estudos moleculares que determinam definitivamente a causa subjacente a cada tipo de HC. Para tal é necessário identificar a mutação responsável e provar que esta origina uma proteína alterada e que, de alguma forma, diminui a síntese e secreção dos hormônios da tireóide.

Defeitos genéticos da organogênese da tireóide

A disgenesia tireoideana (DT), anomalia na embriogênese da glândula tireóidea, é a causa mais freqüente do HC, com 70-80% dos casos (Castanet *et al.*, 2002). Estão inclusos neste grupo: agenesia glandular (ausência da glândula tireóide, 15% dos casos), ectopia tireóidea (tecido tireóideo localizado desde a base da língua até o mediastino, 60% dos casos) e hipoplasia tireoideana (glândula de tamanho reduzido que se situa em posição cervical normal, 10% dos casos). Os outros 20-30% dos pacientes com HC decorrem da deficiência na síntese dos hormônios da tireóide, por defeito em algum dos passos da hormonogênese (Krude *et al.*, 2000).

Na minoria dos pacientes, o HC está associado com mutações nos genes responsáveis pelo desenvolvimento ou crescimento das células foliculares tireoideanas: TTF-1, TTF-2, PAX-8, TSH (Cogdon *et al.*, 2001; Esperance *et al.*, 2008, Congdon, 2001, Al Taji *et al.*, 2007)

Defeitos genéticos da síntese hormonal

O primeiro registro sobre defeitos hereditários comprometendo, parcial ou totalmente determinada etapa da síntese hormonal foi publicado a cerca de 100 anos por Pendred e Osler (Medeiros *et al.*, 2002).

Os defeitos de síntese hormonal acontecem em aproximadamente 20% das crianças com HC (geralmente associado à presença de bócio) (Delange, 1988). Os vários defeitos genéticos resultam de mutações em genes envolvidos na síntese, no armazenamento, na secreção, no transporte ou na utilização do hormônio tireoideano. Entre as alterações mais freqüentes na disormonogênese destaca-se o defeito na atividade da tireoperoxidase (TPO) (1/40.000 nascidos vivos), comprometendo a incorporação de iodeto à molécula de tireoglobulina (Knobel e Medeiros, 2003). Estudos de ligação genética estabeleceram a relação entre o defeito de incorporação de iodeto e mutações no gene da TPO, com padrão de herança autossômica recessiva, indicando que o defeito deve comprometer os dois alelos, um em cada cromossomo, para que ocorra falha na atividade catalítica da enzima. (Manglabruks *et al.*, 1991)

Defeitos em outros genes também foram associados à disormonogênese, como no transporte de iodeto (mutação no *simporter*

Na/I⁻) (Fujiwara *et al.*, 1998); na TG (Rivolta e Targovnik, 2006); mutações no gene PDS (Everett *et al.*, 1999); no DUOX-2 (Moreno *et al.*, 2002) e DEHAL1 (Moreno *et al.*, 2008).

A tireoperoxidase e sua síntese

A peroxidase da tireóide ou tireoperoxidase (TPO) é uma hemoglicoproteína que se encontra na membrana plasmática apical da célula folicular com seu domínio catalítico voltado para o colóide (Vasman *et al.*, 2004). A proteína está distribuída em diferentes localizações subcelulares, como retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e vesículas próximas a membrana apical da célula folicular, na interfase citoplasma-colóide (Hosoya e Morrison, 1967; Taurog *et al.*, 1970; DeGroot & Niepomniszcze, 1977; Medeiros-Neto *et al.*, 1993).

A TPO (acesso no GeneBank MIM#606765) é sintetizada no retículo plasmático rugoso da célula folicular é transferida para a membrana apical através de complexo de Golgi e vesículas exocíticas (DeGroot e Niepomniszcze *et al.*, 1977). É responsável por três reações importantes na hormonogênese: a oxidação de íons de iodeto (I⁻), iodação da tireoglobulina e o acoplamento das tirosinas ionizadas (*coupling*) para a formação dos hormônios T4 e T3 (Taurog, 2000; Larsen *et al.*, 2003). A expressão da TPO é controlada pelo TSH através de um sistema dependente de 3'5'-adenosina monofosfato cíclico (AMPc)/ proteína quinase A (PKA) (Gerard *et al.*, 1989).

Dos agentes oxidantes biológicos, suficientemente fortes, que se conhecem, apenas o H₂O₂ e o O₂ são suficientemente potentes para oxidar

o iodo. Cedo se percebeu que este passo envolveria uma peroxidase (Taurog, 1964).

Biologia molecular e estrutura da TPO

A TPO foi a primeira peroxidase animal cuja sequência aminoacídica completa foi determinada. O isolamento e caracterização por sequenciamento de um clone de cDNA, representando parte da sequência do cDNA total da TPO de porco, foi pela primeira vez descrito por Magnusson *et al* (1986).

Em 1987 três grupos de pesquisadores descreveram a sequência nucleotídica do cDNA da TPO humana (TPOh) (Kimura *et al.*, 1987; Magnusson *et al.*, 1987; Libert *et al.*, 1987). O gene que codifica para a TPO humana está localizado no cromossomo 2p25 e a sequência completa está formada por 150 Kbp e dividida em 17 exons e 16 introns (Endo *et al.*, 1995). O mRNA contem 3048 pares de bases e codifica para uma proteína de 933 aminoácidos com peso molecular de 103 kDA de DNA. O sítio ativo da proteína é composto pelos exons 8,9 e 10 do gene (Kimura *et al.*, 1987, Kimura *et al.*, 1989).

Posteriormente foram descritas as sequências de aminoácidos de outras peroxidases de mamíferos tais como a mieloperoxidase (MPO) (Johnson, *et al.*, 1987), lactoperoxidase (LPO) (Dull *et al.*, 1990), peroxidase salivar (SPO) (Kiser *et al.*, 1990) e a peroxidase eosinófila (EPO) (Sakamaki *et al.*, 1989). Sugere-se uma origem ancestral comum da TPO e da

mieloperoxidase dos granulócitos, pelo fato de haver homologia de 42% entre os dois genes (Libert *et al.*, 1987; Kimura *et al.*, 1989, Kimura, 1990).

A enzima tem cinco sítios de glicosilação, duas pontes dissulfeto e vários sítios de ligação do grupo heme (Figura 2)(Taurog, 1991). Foi demonstrado que a inserção do grupo heme e a interação molecular das proteínas chaperonas calnexina e calreticulina são de crucial importância para a configuração espacial final da proteína TPO, bem como para que a proteína final possa emergir do retículo endoplasmático rugoso (Fayadat *et al.*, 1999; Fayadat *et al.*, 2000). Recentemente foi estabelecido que a TPO sofre outra modificação pós-traducional, a clivagem do propeptídeo por uma endoprotease (Le Fourn *et al.*, 2005).

Figura 2: Modelo proposto da TPO humana mostrando os sítios de glicosilação (G) e os sítios de ligação heme, localizados nos resíduos histidina (his=H). O sítio de clivagem pela tripsina durante os procedimentos de solubilização está localizado na região que está em contato com a membrana plasmática, 847-871 (adaptado de Taurog, 1991)

Outras espécies de mRNA da TPO humana de tamanhos variáveis (4,0kb, 2,1kb e 1,7kb) estão presentes em culturas de células tireóideas

(Nagayama *et al.*, 1989). De todas as variantes sabe-se que apenas a TPO3 e a TPO4 são enzimaticamente ativas, no entanto, apresentam um tempo médio de vida mais curto do que o observado para a proteína normal, TPO1 (Ferrand *et al.*, 2003). O papel dessas TPOs menores, possivelmente produtos de clivagem da proteína ou de *splicing* alternativo do mRNA da TPO 1, ainda não foi elucidado (Figura3).

Figura 3: Esquema representativo das variantes da TPO e deleções de seus exons. Os quadros em negrito indicam as posições das Q-PCR (Di Cristofaro *et al.*, 2006).

Mutações no gene TPO em humanos

Até o momento foram descritas 54 mutações, praticamente ao longo de todo gene TPO. São mutações missense e nonsense (n=31), mutações em sítios de *splicing* (nas bordas exon/intron) (n=7), deleções (12) ou inserções (4) (Tabela 2).

TABELA 2: Mutações no gene TPO humano

EXON/INTRON	MUTAÇÃO	PROTEINA	REFERÊNCIA
2	47_67(DUP 20)	C11fsX78	Bikker <i>et al</i> , 1994
3	157G>C	A53P	Niu <i>et al</i> , 2002
4	493G>C	r.spl.?	Bakker <i>et al</i> , 2000
4	215delA/	Q72fsX86	Rivolta <i>et al</i> , 2007
IVS4(ds)	349G>C	r.spl.?	Bikker <i>et al</i> , 2000
5	387delC	N129fsX79	Rivolta <i>et al</i> , 2003
5	391T>C	S.131P	Rodrigues <i>et al</i> , 2005
5	387delC	N129fsX208	Rivolta <i>et al</i> , 2007
6	613C>T	R175X	Avbelj <i>et al</i> , 2007
7	808G>A	D240N	Kotani <i>et al</i> , 1999
7	703C>T	Q235X	Pfarr <i>et al</i> , 2006
8	843del1C	A281fsX36	Wu <i>et al</i> , 2002
8	920>G ^a	N307T	Rivolta <i>et al</i> , 2003
8	1183_1186GGCC	R396fsX76	Abramowicz <i>et al</i> , 1992
8	129G>A	V433M	Rivolta <i>et al</i> , 2003
8	1335delC	H44fsX5	Bakker <i>et al</i> , 2000
8	1274 ^a >G	N425S	Rodríguez <i>et al</i> , 2005
8	1222G>A	E378K	Tajima <i>et al</i> , 2005
8	930G>A	P280Por=	Avbelj <i>et al</i> , 2007
8	1159G>A	G387R	Rivolta <i>et al</i> , 2007
IVS8(ac)	1339 ^A >T	1447F/r.spl.?	Bikker <i>et al</i> , 1997
9	1357T>G	Y453P	Bikker <i>et al</i> , 1995
9	1373T>C	L458P	Ambrugger <i>et al</i> , 2001
9	1472G>A	R491H	Ambrugger <i>et al</i> , 2001
9	1477G>A	G493S	Wu <i>et al</i> , 2002
9	1496C>T	P499L	Rivolta <i>et al</i> , 2003
9	1581G>T	W527C	Bakker <i>et al</i> , 2000
9	1687G>T	G533C	Kotani <i>et al</i> , 2003
9	1519_1539del	A477_N483del	Avbelj <i>et al</i> , 2007
9	1357T>G	Y453D	Pfarr <i>et al</i> , 2006
10	1618C>T	R540X	Bikker <i>et al</i> , 1996
IVS10(ds)	1768G>A	r.spl.?	Bikker <i>et al</i> , 1995
IVS10(ds)	1768+1G>A	r.spl.?	Bakker <i>et al</i> , 2000
10	1808-13del	D574/L575del	Kotani <i>et al</i> , 2003
11	1943G>A	R648Q	Pannain <i>et al</i> , 1999
11	1978C>G	Q66OE	Santos <i>et al</i> , 1999
11	1993>T ^C	R665w	Umeki <i>et al</i> , 2002
11	2089G>A	G667S	Avbelj <i>et al</i> , 2007
12	2077C>T	R.693W	Bakker <i>et al</i> , 2000
12	2153_2154del12	718X	Bakker <i>et al</i> , 2000
13	2243delT	V748fsX49	Niu <i>et al</i> , 2002
13	2268_2269insT	E757X	Niu <i>et al</i> , 2002
13	2311G>A ^C	G771R	Umeki <i>et al</i> , 2002
IVS13(ds)	2386G>T	N796Y	Wu <i>et al</i> , 2002
14	2395G>A	E799K	Bikker <i>et al</i> , 1995
14	2413delC	H805fsX27	Wu <i>et al</i> , 2002
14	2415_242insC ^a	C808fsX71	Bikker <i>et al</i> , 1995
14	2422delT	C808fsX23	Bikker <i>et al</i> , 2000
14	2422T>C	C808R	Rivolta <i>et al</i> , 2003
14	2565C>T	C825C	Avbelj <i>et al</i> , 2007
14	2512T>A	C838S	Rodrigues <i>et al</i> , 2005
15	2669G>A	G860R	Avbelj <i>et al</i> , 2007
IVS16	Del10pb	r.spl.?	Tajima <i>et al</i> , 2005
16	2748G>A	r.spl.?	Rodríguez <i>et al</i> , 2005

A nomenclatura das alterações encontradas está de acordo com as regras definidas pela HGVS (Human Genome Variation Society) e considerado o primeiro A do codon de iniciação como posição +1. A numeração das posições nucleotídicas exônicas está de acordo com a sequência de referência do mRNA da TPO, número de acesso Gene Bank: (NM_000547). ds: sítio “doador” de splicing; ac: sítio “aceptor” de splicing.

Defeitos na geração de peróxido de hidrogênio e o gene DUOX2

A H_2O_2 é essencial nas reações catalisadas pela TPO, agindo como cofator enzimático na reação de oxidação do I^- . A geração de H_2O_2 foi detectada na região apical da célula folicular tireóidea, e mostrou-se dependente de NADPH (Bjorkman e Ekholm, 1984). Foi demonstrado que o aumento da produção de H_2O_2 na tireóide é mediado, pelo menos em algumas espécies, pelo aumento dos concentração de cálcio intracelular em concentrações micro molares (Bjorkman e Ekholm, 1992). A enzima NADPH oxidase tireóidea é responsável pela geração de H_2O_2 e encontra-se nas frações microsomais e de membrana citoplasmática da tireóide (Dupuy *et al.*, 1992; Cardoso *et al.*, 2000). A NADPH oxidase foi recentemente caracterizada em glândulas humanas (Leseney *et al.*, 1999, Cardoso *et al.*, 2000). Dois genes, que codificam flavoproteínas possivelmente relacionados à atividade NADPH oxidase, foram clonados e correspondem a enzimas denominadas oxidases tireoideanas 1 e 2 (ThOx 1 e ThOx 2 ou DUOX1 e DUOX2) (figura 4).

Figura 4: Estrutura das oxidases tireoideanas (DUOX), conforme deduzida através da análise da sequência de aminoácidos. Estão representados os domínios de ligação do NADPH e do FAD (flavina adenina dinucleotídeo). EF-hand – domínios de ligação do cálcio, I a VII – regiões transmembrana da proteína (Adaptado de De Deken *et al.*, 2000).

O gene *DUOX-2* número de acesso no GeneBank (NT_010194) está localizado no cromossoma 15q15.3, está formado por 21.5 Kb e inclui 33 éxons codificantes. O mRNA número de acesso no GeneBank (NM_014080) possui 6376 bp e a proteína está composta por um peptídio sinal de 26 aminoácido, seguido por um peptídeo de 1522 aminoácidos. (De Deken *et al.*, 2000) O gene *DUOX1* é adjacente e possui 83% de homologia com o gene *DUOX2*. A proteína *DUOX2* é transmembranica e se localiza na membrana apical do tireócito. Recentemente foram identificados dois novos genes, *DUOXA1* e *DUOXA2*. *DUOXA2* codifica uma proteína localizada no retículo endoplasmático rugoso (REG) que permite a exportação de *DUOX2* para a membrana apical (Grasberger *et al.*, 2007)

Até o momento somente 22 mutações foram descritas no gene *DUOX2* e de *DUOXA2* (Tabela 3) associadas ao HC com defeito de incorporação de iodeto (Moreno e Visser, 2007).

Tabela 3: Mutações no gene *DUOX2* humano

EXON/INTRON	MUTAÇÃO	PROTEÍNA	REFERÊNCIA
2	108G>C	p.Q36H	Varela et al., 2006
5	738C>T	Y246X	Zamproni et al., 2008
5	Ins602g	Ins602fsX300	Pfarr et al., 2006
9	1126C>T	R376W	Vigone et al., 2005
11	1300C>T	R434X	Moreno et al., 2002
11	1253delG	G418fsX482	Varela et al., 2006
12	1435_1440delCTATCCinsAG	L479SfsX2	Maruo et al 2008
12	1516G>A	D506N	Pfarr et al., 2006
13	1588A>T.	K530X	Maruo et al 2008
15	1883delA	K628RfsX10	Maruo et al 2008
16	2033 ^a >G	H678R	Maruo et al 2008
16	1946C>A	p.A649E	Moreno et al., 2002
16	2056C>T	Q686X	Moreno et al., 2002
16	2101C>T	R701X	Moreno et al., 2002
18	2524C>T	p.R842X	Vigone et al., 2005
19	2635G>A	E879K	Maruo et al 2008
19	2634G>A	R885Q	Maruo et al 2008
19	Ins602fsX300	Ins606	Pfarr et al., 2006
19	IVS19-2A>C	IVS19-2A>C	Varela et al., 2006
22	2895_2898del	S9651fsX994	Moreno et al., 2002
24	3200T>C	L1067S	Maruo et al 2008
25	3329G>A	R1110Q	Ohye et al., 2008

2- OBJETIVOS

1- Este estudo visou realizar o rastreamento e análise das mutações identificadas no gene TPO em pacientes com Hipotireoidismo Congênito com defeito total e parcial de incorporação de iodeto.

2- Procurar correlação entre o genótipo e o fenótipo dos pacientes.

3. CASUÍSTICA

Pacientes

Foram estudados 34 pacientes com hipotireoidismo congênito, 18 do sexo feminino e 16 masculino, com possível defeito genético no gene TPO oriundos de Minas Gerais. A doença foi diagnosticada através do rastreamento neonatal (teste do pezinho), cinco dias após nascimento. Todas as crianças foram tratadas com L-tiroxina (12,5µg/Kg). Aos três anos os pacientes foram submetidos a testes laboratoriais e a exames radiológicos (ultrassonografia de tireóide e cintilografia) para esclarecimento do diagnóstico etiológico do Hipotireodismo Congênito (Tabelas 4 e 5). O uso da L-tiroxina foi suspenso por quatro semanas antes da realização dos testes. Os pacientes foram divididos em dois grupos considerando os valores de descarga de iodeto no teste de perclorato:

- a): pacientes com defeito total de incorporação de iodeto (DIIT) (n= 13, 9F e 4M), descarga de iodeto após perclorato > 51% (72,8 +16,5%) e valores hormonais (média+DP): TSH: 251,4+214,6 uUI/mL; T4T: 4,87+4,88 ug/dL T4L:0,58+0,49 ug/dL; TG: 285,6+284,6 ng/mL (Tabela 4).
- b) pacientes com defeito parcial de incorporação de iodeto (DIIP) (n=21, 9M e 12M), com descarga de iodeto após perclorato entre 25-50% (36,3+8,8%) e valores hormonais (média+DP): TSH:121,0+171,7uUI/mL, T4T:7,19+3,62 ug/dL, T4L 0,86+0,38 ug/dL, TG: 181,0+160,3 ng/mL (Tabela 5)

Também foram estudadas amostras de DNAs de alguns progenitores das crianças afetadas e de 100 indivíduos brasileiros sem doença tireoideana (controles).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas (Universidade de São Paulo) e termo de consentimento foi assinado pelos pais ou familiares dos pacientes.

4. MÉTODOS

Avaliação da função tireóidea

As dosagens de TSH; T4 total; T4 livre e Tireoglobulina (Tg) séricas foram realizadas empregando-se os estojos comerciais (Elecsys electroquimioluminescência, Roche Diagnostics Corporation Indianópolis, IN).

Teste de perclorato

O teste de perclorato foi realizado aproximadamente o aos três anos de idade da criança. Três semanas após a retirada de L-T4, foi administrado 25 μ Ci de radioiodo (^{131}I) por via oral e após 60 minutos mediu-se a captação de raioiodo (%). Em seguida foi administrado um grama de perclorato de potássio e a captação tireóidea foi medida em intervalos de 15 minutos, durante a primeira hora. A glândula tireóide irá liberar apenas o iodeto já concentrado pela célula folicular, mas ainda não incorporado à TG. Pacientes com defeito parcial de incorporação de iodeto (DPPI) apresentaram descarga do traçador de 25-50%, enquanto os pacientes com defeito total apresentaram descargas maiores que 51%. Em indivíduos com função tireoideana normal, 85%-90% do radioiodo é conservado dentro da glândula tireóide.

Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico dos pacientes portadores de defeito de síntese de TPO e seus familiares através do método de SDS-proteína K (Miller *et al.*, 1988).

Quantificação de DNA

A concentração e pureza do DNA foi calculada por espectrofotometria através da leitura da densidade ótica a 260nm e 280nm (Sambrook *et al.*, 1989), empregando-se o equipamento “Gene Quant” (Amersham-Pharmacia,Uppsala,SE). Foi considerado: $DO_{260nm}=1$ equivalente a 50ng/uL.

Amplificação do gene TPO por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

Cada um dos 17 exons e as bordas exon/intron do gene da TPO foram amplificados por PCR empregando-se iniciadores específicos (Tabela 6). Em todos os casos, um dos iniciadores de cada par continha uma seqüência de 40 pares de bases GC (GC-clamp), para permitir a análise posterior por eletroforese em gel de gradiente denaturante (DGGE) (Myers *et al.*, 1989). Os exons 8 e 14 foram amplificados utilizando-se 2 pares de iniciadores para cada exon devido ao tamanho dos mesmos (Bikker *et al.*, 1995).

As reações foram feitas em 25µL, contendo de 100-300ng de DNA genômico, 2,5mM MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP e

dGTP), PCR buffer 0,1U de *Taq* polimerase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) e 10 μ M de cada iniciador. As amostras foram denaturadas a 95°C por 3 minutos. Posteriormente foram realizados 40 ciclos de amplificação: 95°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Depois do último ciclo, as amostras foram incubadas a 72°C por 10 minutos para conferir uma completa extensão. Os produtos da amplificação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio (0,001mg/ml).

Para a amplificação do promotor do gene da TPO foram empregados os iniciadores descritos na tabela 7. As reações foram feitas em 25 μ L, contendo de 100-300ng de DNA genômico, 2,5mM MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), PCR buffer 0,1U de *Taq* polimerase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) e 10 μ M de cada iniciador. As amostras foram denaturadas a 95°C por 3 minutos e posteriormente foram realizados 40 ciclos de amplificação: 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Depois do último ciclo, as amostras foram incubadas a 72°C por 10 minutos para conferir uma completa extensão. Os produtos da amplificação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio (0,001mg/mL).

TABELA 6: Iniciadores específicos para a amplificação de cada um dos exons e bordas exon/intro do gene da TPO (Bikker *et al.*, 1995).

EXON	TAMANHO (bp)	INICIADORES
1	510	5'-GC.Clamp-TCTCCCTGTATAATTTTCCCC-3' 5'-CAGCTTTGCTGAGAGACGC-3'
2	277	5'-GC.Clamp-TCCCATGGCCCTTGTCACT-3' 5'-CAGGAGCTACCATTATGCCC-3'
3	262	5'-GC.Clamp-GAACTGTCATTGCGCTTTGA-3' 5'-TCTGCAATTGCGAAAATCAG03'
4	401	5'-GTGCCTGTCACATTGTCTGG-3' 5'-GC.Clamp-TGCACAAAGTCAAGGTGTCC-3'
5	248	5'-GC.Clamp-TCATGGTTTCCTATTTTTCACA-3' 5'-CATGTTTCAGATCCAACCTTTCAC-3'
6	298	5'-ACTGCTTCTGTGTTCTTCTCCC-3' 5'-GC.Clamp-AAGGCTATTTCCCTCCCTCA-3'
7	410	5'-GC.Clamp-GGTCATCTTTCTGCTACCAC-3' 5'-CTGCTACCCCTGGGAATAGG-3'
8 ^a	303	5'-GC.Clamp-TGACCTTGAACCTCCCTTTG-3' 5'-ACGCGGAGCAGCCCTTCGGC-3'
8B	519	5'-ATGAACGGGTTGACCTCGTT-3' 5'-GC.Clamp-GGAGAGAGAAGCCACGATGC-3'
9	423	5'-GAAGATGCTCTTCCACACTGC-3' 5'-GC.Clamp-AGAGTTCATGGGGACCAGC-3'
10	292	5'-GC.Clamp-CTGAGCCAAGAGCTGTCCTT-3' 5'-CAGCTGCATGAGGTGTGC-3'
11	353	5'-GC.Clamp-AGTTCTGTGAGAGAAACCCTGC-3' 5'-GAACGTGAAGGAAGACGCTC-3'
12	409	5'-CTGTGGGCAGCTGGTCTT-3' 5'-GC.Clamp-AATCAGCTCCTGGGGAAGAT-3'
13	386	5'-GC.Clamp-ACAGGGACGTTGGTGTGTG-3' 5'-TTTCAGAAGCACCTTTTGGC-3'
14 ^a	366	5'-GC.Clamp-CCTCCCCAGAGAGAAGCAC-3' 5'-AGATGGTGATTGACAGTTGCC-3'
14B	203	5'-GC.Clamp-CCTCCCCAGAGAGAAGCAC-3' 5'-GGTGTCTTCTGCACCTCGC-3'
15	340	5'-GC.Clamp-TGGCCAGGACAGGGTATG-3' 5'-ACCTGTGTTAGCTTCGGGAA-3'
16	290	5'-CTACCCTCCACAGTCACGGT-3' 5'-GC.Clamp-CCAGATCCTGTCCAACCACT-3'
17	422	5'-GC.Clamp-AATGTTTGTCTGGATTTTGC-3' 5'-GACAGGAGGATTGCAAGAGTG-3'

Tabela 7: Iniciadores específicos para a amplificação do promoto do gene da TPO

PROMOTOR	TAMANHO (pb)	INICIADORES
Pro TPO 1	375	5' GCCCCTTTTTCACAGGGTAT 3' 5' AACTGCACTGCTGAGTA 3'
Pro TPO 2	342	5' TGAGGATTGAGGGGAGAATG 3' 5' CTCTGGCCGAATGAGTTAGG 3'
Pro TPO 3	451	5' GAAGCCTTTGCATCGTGTTT 3' 5' CCCAAGCCCCTAGTTTTCTT 3'
Pro TPO 4	482	5' AGGATGGCTGAATCCTCAGA 3' 5' GACTTGGAGCCTCTTCATGC 3'
Pro TPO 5	425	5' CCTAGACGCTGGTGCTCTG 3' 5' CCAGACTCGGTGGCTCATTA 3'
Pro TPO 6	466	5' GAGACTTTTGGCAGCAAGGT 3' 5' AGCTGTTGGGTGAAGTCCAG 3'
Pro TPO 7	406	5' GGCTACAAAACGACCTGGAG 3' 5' CCATGAGCCTCCAGAACTG 3'

Amplificação do gene DUOX2

Para amplificação dos 33 exons do gene DUOX2 foram empregados os iniciadores descritos por Moreno *et al.* (2002) (Tabela 8). As amplificações foram feitas em reações de 25µl, contendo 0.5µg de DNA genômico, 50mM KCl, 2mM Tris-HCl, pH 8.4, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 12.5 pmol de cada iniciador e 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad CA). As reações foram incubadas a 95°C por 8 minutos, e 40 ciclos de 1 min a 95°C; 1 min a 60°C e 2 min a 72°C e finalmente 10 min a 72°C.

TABELA 8: Iniciadores específicos para a amplificação dos exons e bordas exon/intron do gene da DUOX (Moreno *et al.*, 2002).

EXON	TAMANHO (bp)	INICIADORES
1	300	5' TGGCGTTTGGATGAAGGT 3'
		5' AGGGATCCTGGGGAACAC 3'
2	226	5' GTAGCTGGGAGCGTAGTGCT 3'
		5' GTGTTCCCCGCAGATTCC 3'
3	275	5' AGGCTTAGGGAGAGGTTTGG 3'
		5' CAGATCAACCCCACTGGTCT 3'
4	307	5' TACGGACGGTTTGTACAG 3'
		5' CGCCTCTCCCCTCCAG 3'
5	246	5' CTCGACCCGGGCTCAC 3'
		5' GTGGCCTCACCGTACAGC 3'
6	312	5' CAGAACCCCCTGCTCATGT 3'
		5' GAGTCTCCCGTGGGCTTG 3'
7 e 8	250	5' GGGCTCAGACCCTTCCAG 3'
		5' GCAGCTCATTCTGCACCTTT 3'
9 e 10	260	5' ACTGAGTCCCTCAGCCCACT 3'
		5' GCTTCCTGGTCCCTTACCAT 3'
12	291	5' GAGGGATGGGGCAACAGT 3'
		5' AGGCTGAGGAGCAGTCTGAG 3'
13	220	5' CTTCCCATCCCAGTGACTTC 3'
		5' GCACCCTCAATCTTGATCCT 3'
14 e 15	301	5' AAGAGGTCTGGCCACATAGC 3'
		5' TTCTCCCAGACTCCTGTCTCTC 3'
17	326	5' CAACCCAAGATCCATTGAGG 3'
		5' TTCTATGCAGCCCAGGTTTC 3'
18 e 19	204	5' GCTTCCAGCATAGGCTTCAC 3'
		5' CTGGACCTGTTTTCTGTTTG 3'
20	325	5' ACCTACCCAAGCCTGACCTT 3'
		5' CCCACCAGGAAGCTCTCATTT 3'
22	213	5' GTTCTCCTGGCTGCAAAGAC 3'
		5' GATATGTGGGTGGGGCCTA 3'
23	305	5' ATGGAGTGGCATTAAAGGGAAG 3'
		5' TCTTAGGATCAGAGGGCTTTCC 3'
24	305	5' CCTGTGCCAAGCTGATGTAA 3'
		5' GCTGCAGCAAAGAGGAAGAA 3'
25	184	5' AGTCTGTCTGGTTGGCATC 3'
		5' CACCCTATGAGTCCCAGGAG 3'
26	208	5' GCTGGAGCCCCTCCT 3'
		5' GACCCCATGGCCAGTATAGA 3'
27 e 28	287	5' CCCAAGCTGAAGTCCTGAGA 3'
		5' TGAAGATTTGGCCTCTGTCTG 3'
29	345	5' GAGCAGGCCTTCTCATCTGT 3'
		5' ATAGGGAAGGGCAGAGATCC 3'
30	251	5' CAGGGTCAGGCTCATTTTCAT 3'
		5' GTCACAATTTCGGCCACCTAT 3'
31 e 32	319	5' GAACTGAGCTGGGTCCTGAT 3'
		5' GCAGGAGAAGGCCAGAGTC 3'
33	286	5' AGGCTCAGGAAGCAGCTTTT 3'
		5' GCACAGAAGAGAAGGCAGGA 3'

Eletroforese em gel de gradiente denaturante: (DGGE)

Inicialmente foram investigadas a presença de alterações dos nucleotídeos, dos fragmentos amplificados por PCR, empregando-se o método de DGGE (Bikker *et al.*, 1995). Essa técnica baseia-se na migração eletroforética de um determinado fragmento de DNA em gel de poliacrilamida contendo gradiente crescente de compostos desnaturantes (uréia e formamida). Cada fragmento de DNA apresentará um perfil de migração eletroforética característica, que depende exclusivamente de sua seqüência nucleotídica. Alterações da mobilidade eletroforética sugerem a presença de mutações e é possível analisar fragmentos de até 1000bp.

Cada um dos exons amplificados foi pesquisado em gradiente de poliacrilamida e temperatura apropriada (Tabela 9) em tampão TAE 1X. Após eletroforese, os géis foram corados com solução de brometo de etídio 0,5ug/mL, por 10 minutos.

Figura 5: DGGE do exon 10. Os fragmentos de DNA dos pacientes 1 e 6 com migração diferente do controle (C) foram seqüenciados.

TABELA 9: Condições de temperatura e gradiente do DGGE para análise de mutações no gene TPO

EXON	GRADIENTE (%)	TEMPERATURA (°C)
1	40-50	60 ^o
2	28-35	60 ^o
3	55-80	60 ^o
4	20-40	60 ^o
5	42-50	60 ^o
6	50-65	60 ^o
7	35-40	60 ^o
8 ^a	60-80	65 ^o
8B	55-75	65 ^o
9	55-65	60 ^o
10	47-68	63 ^o
11	50-70	60 ^o
12	40-55	60 ^o
13	45-60	63 ^o
14A	60-75	60 ^o
14B	65-80	60 ^o
15	40-60	60 ^o
16	65-80	64 ^o
17	40-45	60 ^o

Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR que apresentaram padrão anormal de migração no DGGE foram purificados com o estojo comercial “Concert Rapid PCR Purification System” (Life Technologies), seguindo-se o protocolo indicado pelo fabricante, para remoção do excesso de iniciadores e dNTP, para então serem empregados nas reações de seqüenciamento.

Seqüenciamento

Foram utilizados dois equipamentos para o seqüenciamento dos fragmentos amplificados usando os mesmos iniciadores utilizados nas reações de PCR:

1) ABI 377 (Applied Biosystems), utilizando o Kit DNA Sequencing Big Dye Terminator v 3. O Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems)

2) MegaBace (Amersham Biosciences), utilizando o estojo comercial DYEnamic ET dye terminator Kit (Amersham Biosciences)

AS seqüências obtidas foram comparadas com as disponíveis em banco de dados da internet, para TPO: número de acesso do GenBank (NT_008046) e para DUOX2: número de acesso do GeneBank (AF230496 e NT010194).

Clonagem de fragmentos de PCR

Produtos amplificados por PCR foram clonados no vetor pcr2.1TOPO utilizando o estojo comercial “TOPO TA Cloning Kit” (Novitrogen). O vetor recombinante foi transformado em células *E.coli* competentes comerciais “Transformnug one shot component *E. coli* cells” (Novitrogen) segundo o protocolo do fornecedor.

Alinhamento da seqüência proteica

O alinhamento das seqüências de aminoácidos da TPO identificada nos pacientes com a de outras espécies foi realizada utilizando o programa CLUSTAL (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

Análise da estrutura secundária da proteína mutada

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

Resultados

Alterações genéticas no gene TPO

A análise da sequência dos exons, das bordas exon/intron e da sequência promotora do gene TPO, após rastreamento por DGGE e sequenciamento, permitiu identificar até o presente momento 8 novas alterações, 4 mutações já descritas na literatura e 33 polimorfismos (10 novos) (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10: Alterações de sequência com troca de aminoácidos identificadas nos pacientes com DIIT e DIIP de Minas Gerais.

EXON	POSIÇÃO	TROCA DE NUCLEOTÍDEO	TROCA DE AMINOÁCIDO	FENÓTIPO
4	292	C>A	Leu68Ile	DIIT
8	1046	G>A	Gly319Glu	DIIT
8	1277	GGCCIns	396fsX76	DIIT
8	1367	C>G	Ala426Gly	DIIP
10	1842	G>A	Arg584Gln	DIIT
11	1942	G>A	Val618Met	DIIP
11	2068	C>G	Gln660Gly	DIIT e DIIP
11	2083	C>T	Arg665Trp	DIIT
14	2606	T>A	Cys838Ser	DIIP
16	2738	C>T	Pro883Leu	DIIT
16	2815	G>A	Ala909Thr	DIIP
16	2863	Dupl10pb	A909fsX49	DIIP

Em negrito estão indicados as novas alterações de sequência.

Tabela 11: Polimorfismos identificados em pacientes com DIIT e DIIP de Minas Gerais

LOCALIZAÇÃO NO GENE	POSIÇÃO	TROCA DE NUCLEOTÍDEO	FENÓTIPO
Promotor	-1197G/A	G>A	DIIP/DIIT
Promotor	-800A/G	A>G	DIIP/DIIT
Promotor	-706 C/T	C>T	DIIP/DIIT
Promotor	-36	A>G	DIIP
1	16	G>A	DIIP
2	102	C>G	DIIT
2	203	G>C	DIIT
2	222	C>G	DIIP
2	233	C>G	DIIT
IVS3	+18	InsGG	DIIP
IVS4	+31	T>C	DIIP-DIIT
IVS6	+15	C>T	DIIP
IVS6	+53	G>A	DIIP
7	859	G>T	DIIP-DIIT
8	1207	G>T	DIIP
8	1283	G>C	DIIT
IVS9	+19	C>A	DIIP
11	1987	G>A	DIIP
IVS11	-37	G>A	DIIP-DIIT
11	1881	C>T	DIIP
11	2088	C>T	DIIP-DIIT
12	2235	C>T	DIIP-DIIT
12	2263	A>C	DIIP-DIIT
12	2151	G>A	DIIT
13	2376	C>A	DIIP
IVS13	+16	T>A	DIIT
IVS14	+31	C>A	DIIP
IVS15	-43	C>T	DIIP
15	2630	T>C	DIIP-DIIT
15	1753	T>C	DIIT
17	2951	C>T	DIIP-DIIT
17	2962	A>C	DIIP-DIIT
17	2971	T>C	DIIP-DIIT
17	3986	A>G	DIIP-DIIT
17	2973	G>C	DIIP-DIIT
17	3007	G>T	DIIP-DIIT

Em negrito estão indicados os novos polimorfismos.

Os resultados do DGGE e sequenciamento de cada um dos pacientes encontram-se nas tabelas 12 e 13.

PACIENTES COM DEFEITO TOTAL DE INCORPORAÇÃO DE IODETO

Paciente 37

Este paciente com descarga de iodo de 64% apresentou a troca 2738C>T no exon 16 em homozigose, não descrita na literatura que promove a substituição de leucina por prolina na posição 883 (Pro883Leu) (Figura 6).

Figura 6: Cromatograma do sequenciamento do exon 16 do paciente 37 mostrando a alteração 2738C>T (Pro883Leu).

Também foram identificados os seguintes polimorfismos:

Exon 1: -35G>A, em heterozigose

16A>G, em heterozigose (região não traduzida)

Exon 2:102C>G, em heterozigose

Exon 3: +18InsGG, em homozigose (no intron)

Exon 6: -47G>C, em homozigose (no intron)

Exon 8: 1207G>T, em heterozigose (Ala257Ser)

1283G>C, em homozigose (Ser398Thr)

Exon 11: 2088C>T, em heterozigose

-37G>A, em homozigose (no intron)

Exon 12: 2235C>T, em heterozigose

2263A>G, em heterozigose

Exon 15: 2630T>C, homozigose (Val847Ala)

Paciente 44

No paciente com descarga de iodeto de 56,5% foram identificados somente os seguintes polimorfismos:

Exon 2: 213A>T, em heterozigose

Exon 4: +31C>T, em heterozigose, (no intron);

Exon 6: -47G>C, em homozigose (no intron)

Exon 8: 1207G>T, em homozigose (Ala257Ser)

1283G>C, em homozigose (Ser398Thr)

Exon 15: 2630T>C, em heterozigose (Val847Ala)

Exon 17: 2973T>C, em homozigose

Paciente 48

Neste paciente, que apresentou descarga de iodeto após perclorato de 100%, foi identificada inserção de 4 pares de bases (GGCC) (1277GGCCIns) no exon 8, em heterozigose, que cria um novo códon de terminação no exon 9 (Abramowicz et al.,1992) (Figura 7). Nos pais e irmão não foi identificada esta mutação (Figura 6)

Figura 7: cromatograma do sequenciamento do exon 8 do paciente 48 mostrando a inserção 1277GGCC em heterozigose.

Figura 8: Heredograma da família do paciente 48 (↓) portador da mutação 1277GGCCIns em heterozigose.

O paciente também apresentou os seguintes polimorfismos:

Promotor: -1197G>A, em homozigose;

-800A>G, em homozigose;

-706A>G, em homozigose;

-35A>A, em homozigose.

Exon 1: 16A>A, em homozigose

Exon 2: 102C>G, em heterozigose

Exon 4: +31T>C, em heterozigose (no intron)

Exon 7: 859G>T, em heterozigose (Ala257Ser)

Exon 8: 1207G>T, em heterozigose (Ala373 Ser)

1283G>C, em heterozigose (Ser398Thr)

Exon 11: 2088C>T, em heterozigose

Exon 12: 2235C>T, em heterozigose

2263A>C, em heterozigose (Thr725Pro)

Exon 15: 2630T>C, em homozigose (Val847Ala)

Como o seqüenciamento completo do gene TPO revelou a presença de uma única mutação, em heterozigose nesse gene, foram seqüenciados também os 33 exons do gene DUOX2.

Foram identificadas as seguintes alterações de seqüência, todas em heterozigose: 413C>T (Pro100Leu); 598 G>A (Gly131Arg), 2033A>G (His678Arg), 2102 G>A (Arg701Gln). Também foram detectados polimorfismos que não provocam troca de aminoácido (567C>T; 597G>C; 633C>T; 1461 G>C; gIVS14 +65C>A; 2281 G>A; gIVS17 +10C>T; 3200 C>T; gIVS25 +15T>A; gIVS33 +29 G>T).

Para determinar se as alterações de nucleotídeos no gene DUOX-2 com troca de aminoácido eram mutações foi analisada a presença dos mesmos nas amostras de DNA dos indivíduos controles. Verificamos que todas as alterações tinham freqüência maior que 1% na população controle, indicando que todas eram polimorfismos.

Paciente 61

Neste paciente com descarga de iodeto de 89% também foi identificada mutação 1277GGCCIns no exon 8, em homozigose, que cria um novo códon de terminação no exon 9 (Abramowicz et al, 1992). Ambos progenitores e a irmã são portadores desta mesma inserção em heterozigose (Figuras 89 e 10)

Figura 9: Cromatogramas do sequenciamento do exon 8 mostrando inserção GGCC na posição 12277, em homozigose.

Figura 10: Heredograma da família do paciente 61 (↓) portador da mutação 277GGCCIns em homozigose.

Neste paciente também foram identificados os seguintes polimorfismos:

Exon 2: 102C>G, em heterozigose

Exon 4: +31 T>C, em homozigose (no intron)

Exon8: 1207G>T, em heterozigose (Ala257Ser)

1283G>C, em heterozigose, (Ser398Thr)

Exon 12: 2235C>T, em homozigose

Exon 15: 2630T>C, em homozigose (Val847Ala)

Paciente 65

Neste paciente com descarga de iodeto de 53,20% somente foram identificados os seguintes polimorfismos:

Promotor: -1197G>A, em homozigose

- 800A>G, em homozigose

-706A>G, em homozigose

Exon 2: 233C>G, em homozigose

Exon 3: +18InsGG (no intron)

Exon 4: +31T>C, em homozigose (no intron)

Exon 6: -47G>C, em homozigose (no intron)

Exon 7: 859G>T, em heterozigose (Ala 257Ser)

Exon 9: +19InsA (no intron)

Exon 11: 2088C>T, em homozigose

Exon 12: 2235C>T, em homozigose

2263A>C, em homozigose (Thr725Pro)

Exon 15: 2630T>C, em homozigose (Val847Ala)

Exon 17: 2973T>C, em homozigose

3007G>T, em homozigose

Paciente 70

Neste paciente com descarga de iodeto de 77,40% foram identificadas a nova alteração no exon 10, que troca 1842G>A em heterozigose, que leva a substituição de arginina por glutamina na posição 584 (Arg584Gln) e no exon 11, que troca 2083C>T, em heterozigose, que substitui arginina por triptofano na posição 665 (Arg665Trp) (Umeki et al 2002) (Figura 11).

Figura11: Cromatogramas do seqüenciamento do exon 10 mostrando (a) alteração de seqüência trocas 1842 G>A (Arg584Gln), em heterozigose e (b) do exon 11 mostrando a alteração 2083 C>T (Arg665Trp), em heterozigose.

A mãe da paciente apresentou as mesmas mutações, em heterozigose (Figura 12).

Figura 12: Heredograma da família da paciente 70 (↓) portadora das mutações Arg584Gln e Arg665Trp, em heterozigose.

Também foram identificados os seguintes polimorfismos:

Promotor: -1197G>A, em homozigose

-800A>G, em homozigose

-706A>G, em homozigose

Exon 2: 102C>G, em heterozigose

Exon 7: 859G>T, em heterozigose (Ala257Ser)

Exon 8: 1283G>C, em heterozigose (Ser398Thr)

Exon 11: 2088C>T, em heterozigose

Exon 12: 2151G>A, em heterozigose

2235C>T em heterozigose

2263A>C, em homozigose (Thr725Pro)

Exon 15: 2630T>C, em homozigose (Val847Ala)

Paciente 75

Neste paciente, com descarga de iodeto de 92,10%, foi identificada a nova alteração de seqüência 292C>A no exon 4, que leva a troca de leucina por isoleucina na posição 68, em heterozigose (Leu68Ile) (Figura 13).

Figura 13: Cromatograma do sequenciamento do exon 4 mostrando a alteração de seqüência 292 C>T(Leu68Ile), em heterozigose.

Também foram identificados os seguintes polimorfismos:

Promotor: -1197G>A, em homozigose

Exon 1: -35A>G, em homozigose (no intron)

16G>A, em heterozigose (no intron)

Exon 3: +18InsGG (no intron)

Exon 6: -47G>A, em homozigose (no intron)

Exon 7: 859G>T, em heterozigose (Ala257Ser)

Exon 9: InsA+19 (no intron)

Exon 11: 1881C>T, em homozigose

2088C>T, em heterozigose (Thr725Pro)

Exon 12: 2235C>T, em heterozigose

2263A>C, em heterozigose (Thr725Pro)

Exon 15: 2630T>G, em homoziose (Val847Ala)

Exon 17: 2973T>C, em homozigose

Paciente 96

Neste paciente com descarga de iodeto de 82,20% foram identificados somente os seguintes polimorfismos:

Exon 2: 102C>G, em homozigose

Exon 3: +18InsGG (no intron)

Exon 4: +31T>C, em homozigose (no intron)

Exon 6: -47G>C, em homozigose (no intron)

Exon 8: 1207G>T, em homozigose (Ala 373Ser)

1283G>C, em homozigose (Ser398Thr)

Paciente 100

Neste paciente com descarga de iodo de 60,40% foram identificados somente os seguintes polimorfismos:

Exon 1: -35 A>G, em homozigose (no intron)

16G>A, em homozigose

Exon 3: +18InsGG (no intron)

Exon 4: +31T>C, em heterozigose (no intron)

Exon 7: 859G>T, em heterozigose (Ala257Ser)

Paciente 111

Neste paciente com descarga de iodo de 54% foram identificados somente os seguintes polimorfismos:

Exon 7: 859G>T, em homozigose (Ala373 Ser)

Exon 8: 1283G>C, em homozigose (Ser398Thr)

1207G>T, em heterozigose (Ala373Ser)

Exon 11: 2088C>T, em homozigose (Ser398Thr)

Paciente 130

Neste paciente com descarga de iodo de 97,70% foram identificados os seguintes polimorfismos:

Promotor: -706A>G, em homozigose

-800A>G, em homozigose

-1197G>A, em homozigose

Exon 1: -35A>G, em heterozigose

Exon 6: -47G>C, em homozigose (no intron)

Exon 8: 1207G>T, em homozigose (Ala373Ser)

1283G>C, em homozigose (Ser398Thr)

Exon 12: 2235T>C, em homozigose

2263A>C em homozigose (Thr725Pro)

Paciente 181

Neste paciente com descarga de iodeto de 80,30% foram identificados os seguintes polimorfismos:

Exon 3: +18 InsGG (no intron)

Exon 4: +31T>C, em heterozigose (no intron)

Exon 8: 1207G>T, em heterozigose (Ala373Ser)

1283G>C, em heterozigose (Ser398Thr)

Exon 9: +19 InsA (no intron)

Exon 11: 2088C>T, em heterozigose

Exon 12: 2235 T>C, em homozigose

Exon 15: 2630C>T, em homozigose (Val847Ala)

Paciente 202:

Neste paciente com descarga de iodeto de 62%, foi identificada a mutação 2068G>A, em heterozigose no exon 11, que leva a substituição de glutamina por ácido glutâmico na posição 660 (Gln660Glu) (Santos et al., 1999) e a nova alteração no exon 8, em heterozigose que leva a troca de glicina por ácido glutâmico na posição 319 (Gly319Glu) (Figura 14).

Figura14: Cromatograma, da fita reversa, do exon 8 do paciente mostrando a alteração 1046G>A, em homozigose (Gly319Glu)

Também foram identificados os seguintes polimorfismos

Exon 1: -35A>G, em homozigose

16G>A, em homozigose

Exon 9: +19InsA (no intron)

Exon 13: +16T>A, em heterozigose (no intron)

PACIENTES COM DEFEITO PARCIAL DE INCORPORAÇÃO DE IODETO

Paciente 3

Neste paciente com descarga de iodo de 31% foi identificada a nova alteração 1367C>G no exon 8, em heterozigose que promove a troca de alanina por glicina na posição 426 (Ala426Gly) (Figura 15).

Figura 15: Cromatograma do sequenciamento do exon 8, mostrando a alteração de sequência 1367C>G(Ala426Gly), em heterozigose.

Também foram identificados os seguintes polimorfismos:

Promotor: -1197G>A, em heterozigose

-800A>G, em heterozigose

-706A>G, em heterozigose

Exon1: 16A>G, em heterozigose

Exon 7: 859G>T, em heterozigose (Ala257Ser)

Exon 8: 1283G>C, em homozigose (Ser398Th)

Exon 11: -37G>C, em heterozigose (no intron)

1181C>T, em heterozigose.

Neste caso, também foram seqüenciados os 33 exons do gene DUOX2.

Foi identificada a alteração de seqüência 2033A>G (His678Arg) em heterozigose e os polimorfismos que não provocam troca de aminoácido (567C>T; 597G>C; 633C>T; 2281 G>A; gIVS17 +10C>T; 3200 C>T; gIVS25 +15T>A). Todas as alterações foram detectadas em mais de 1% na população controle.

Paciente 4

Neste paciente com descarga de iodeto de 46,70% somente foram identificados os seguintes polimorfismos:

Exon 7: 859G>T, em heterozigose (Ala257Ser)

Exon 8: 1283G>C, em heterozigose (Ser398Thr)

Exon 11: -37G>A, em heterozigose (no intron)

1881C>T, em heterozigose

2088C>T, em homozigose

Paciente 12

Neste paciente com descarga de iodeto após de 42% foram identificados somente os seguintes polimorfismos:

Exon 1: -35 A>G, em heterozigose

Exon 8: 1283G>C, em heterozigose (Ser398Thr)

1207G>T, em heterozigose

Exon 11: -37G>A, em heterozigose (no intron)

1881C>T, em heterozigose

2088C>T, em homozigose

Exon 15: 2630T>C, em homozigose (Val847Ala)

-43C>T, em heterozigose (no intron)

Paciente 14

Neste paciente com descarga de iodeto de 39% foi identificado somente o seguinte polimorfismo:

Exon 8: 1283G>C, em heterozigose (Ser398Thr)

Paciente 16

Neste paciente com descarga de iodeto de 40,80% foi identificada a nova alteração de sequência 1942G>A, em heterozigose, no exon 11, que promove a troca de valina por metionina na posição 818 (Val618Met) (Figura 16).

Figura 16: cromatograma do seqüenciamento, da fita reversa, do exon 11 mostrando a alteração 1942 G>A (Val618Met), em heterozigose.

Foram identificados também os seguintes polimorfismos:

Exon 8: 1283G>C, em homozigose (Ser398Thr)

1207G>T, em heterozigose (Ala373Ser)

Exon 11: 1881C>T, em heterozigose

Exon 13: 2376C>T, em heterozigose

Paciente 35

Neste paciente com descarga de iodeto de 48,20% foram identificadas as mutações 2068G>C, em heterozigose, que promove a troca de glutamina por glicina na posição 660 (Gln660Gly) (Santos et al 1999) e a mutação no exon14 na posição 2602T>A, em heterozigose, que leva a troca de cisteína por serina na posição 838 (Cis838Ser) (Figura 17).

Figura17: Cromatogramas do sequenciamento mostrando a mutação de seqüência do exon 14, 2062T>A (Cis838Ser) em heterozigose.

Também foram identificados os seguintes polimorfismos:

Exon 1: 16G>A, em heterozigose

Exon 7: 859G>T, em heterozigose (Ala 257Ser)

Exon 11: 1881C>T, em heterozigose

Exon 17: 2973T>C, em homozigose

3007G>T, em homozigose

Paciente 69

Neste paciente com descarga de iodeto de 38,60% foram identificadas duas novas alterações de seqüência nucleotídica, a troca 2815G>A, em heterozigose, que promove a troca de alanina por treonina na posição 909 (Ala909Thr) e a duplicação de 10pb na posição 2863, que altera o quadro de leitura, introduzindo um novo codon de parada na região antes não traduzida do DNA e adiciona 49 aminoácidos à proteína (Figura18).

Figura 18: Cromatograma do sequenciamento do exon 16 do paciente 69 mostrando as alteração de seqüência 2815G>A e 2863dupl10pb.

Para constatar se as alterações identificadas formavam uma heterozigose composta, foi realizada a clonagem do fragmento de DNA do paciente contendo o exon 16, amplificado por PCRs, no vetor TOPO-TA. Vários clones dos plasmídios recombinantes foram seqüenciados. Foi verificado que ambas alterações genômicas localizavam-se no mesmo alelo (Figura19). Esta metodologia foi usada devido a falta dos DNAs dos progenitores.

Figura 19: Cromatogramas do sequenciamento do exon 16 clonado no vetor TOPO, a) confirmando que ambas as mutações 2863 Dupl10pb (A909fsX49) e 2815 G>A (Ala909Thr) se encontravam no mesmo alelo (sequenciamento da fita reversa) b) alelo sem as mutações.

Também foram identificados os seguintes polimorfismos:

Promotor: -706A>G, em heterozigose

-800A>G, em heterozigose

-1197G>A, em heterozigose

Exon 7: 859G>T, em heterozigose (Ala 257Ser)

Exon 11: 2088C>T, em heterozigose

Exon 12: 2235T>C, em heterozigose

2263A>C, em heterozigose (Thr725Pro)

Paciente 80

Neste paciente com descarga de iodeto de 37,30% foi identificado somente o seguinte polimorfismo:

Exon 7: 859G>T em heterozigose (Ala257Ser)

Paciente 93

Neste paciente com descarga de iodeto de 29,80% foram identificados os seguintes polimorfismos:

Promotor: -706A>G, em homozigose

-800A>G, em homozigose

-1197G>A, em homozigose

Exon 1: - 35 A>G, em heterozigose

Exon 2: 222C>G, em heterozigose

Exon 3: +18InsGG (no intron)

Exon 7: 859G>T, em heterozigose (Ala257Ser)

Exon 9: +19InsA (no intron)

Exon 15: 2630T>C, em homozsigose (Val847Ala)

Exon 17: 2973T>C, em homozigose

3007G>T, em homozigose

Paciente 98

Neste paciente com descarga de iodeto de 28,40% foram identificados os seguintes polimorfismos:

Promotor: -706A>G, em homozigose

-800A>G, em homozigose

-1197G>A, em homozigose

Exon 1: -35 C>T, em heterozigose,

Exon 2: 222C>G, em heterozigose

Exon 3: +18InsGG (no intron)

Exon 7: 859G>T, em heterozigose (Ala257Ser)

Exon 9: +19InsA (no intron)

Exon 11: 2088C>T, em heterozigose

Exon 12: 2235A>C, em homozigose

2263A>C, em homozigose (Thr725Ala)

Exon 15: 2630T>C, em homozigose (Val847Ala)

Exon 17: 2973T>C, em homozigose

3007G>T, em homozigose

Paciente 101

Neste paciente com descarga de iodeto de 37,10% foram identificados somente os seguintes polimorfismos:

Exon 1: -35A>G, em heterozigose

16G>A, em heterozigose

Paciente 102

Neste paciente com descarga de iodeto de 33,50% foram identificados somente os seguintes polimorfismos:

Exon 4: +31T>C, em homozigose (no intron)

Exon 7: 859G>T, em heterozigose (Ala257Ser)

Exon 12: 2235T>C, em homozigose

2263A>C, em homozigose (Thr725Pro)

Exon 15: 2630T>C, em homozigose (Val847Ala)

Paciente 106

Neste paciente, com descarga de iodeto de 25%, foram identificados os seguintes polimorfismos:

Exon 7: 859G>T, em homozigose (Ala257Ser)

Exon 11: 2088C>T, em homozigose

Paciente 112

Neste paciente com descarga de iodeto de 25% foram identificados somente os seguintes polimorfismos:

Exon 6: +15 C>T, em heterozigose (no intron)

Exon 11: 2088C>T, em homozigose

Exon 12: 2235T>C, em homozigose

2263A>C, em homozigose (Thr725Pro)

Exon 17: 2973 T>C, em homozigose

3007 G>T, em homozigose.

Paciente 113

Neste paciente com descarga de iodeto de 27,90% foi identificado somente o seguinte polimorfismo:

Exon 4: +31T>C, em homozigose (no intron)

Paciente 125

Neste paciente com descarga de iodeto de 42,20% foram identificados somente os seguintes polimorfismos:

Exon 7: 859G>T, em heterozigose (Ala257Ser)

Exon 8: 1283G>C, em homozigose (Ser398Thr)

1207G>T, em heterozigose (Ala373Ser)

Paciente 136

Neste paciente com descarga de iodeto de 32,90% foram identificados somente os seguintes polimorfismos:

Exon 7: 859G>T, em homozigose (Ala257Ser)

Exon 11: 2088C>T, em homozigose

Exon 12: 2263A>C, em heterozigose (Thr725Pro)

Paciente 137

Neste paciente com descarga de iodeto de 32,9% foram identificados os seguintes polimorfismos:

Exon 11: 2088C>T, em heterozigose

Exon 12: 2235T>C, em heterozigose

2263A>C, em heterozigose (Thr 725Pro)

Paciente 143

Neste paciente com descarga de iodeto de 43% foram identificados somente os seguintes polimorfismos:

Exon 7: 859G>T, em heterozigose (Ala257Ser)

Exon 11: 2088C>T, em heterozigose

Exon 12: 2235T>C, em heterozigose

2263A>C, em heterozigose (Thr725Pro)

Paciente 169

Neste paciente com descarga de iodeto de 43% foram identificados somente os seguintes polimorfismos:

Exon 1: -35A>G, em heterozigose

16G>A, em heterozigose

Exon 7: 859G>T, em homozigose

Exon 11: 2088C>T, em homozigose

Paciente 197

Neste paciente com descarga de iodeto de 34% foram identificados somente os seguintes polimorfismos:

Exon 4: +31 do intronT>C em homozigose

Exon 8: 1223 C>G, em heterozigose

Exon 12: 2235C>T, em heterozigose

2263A>C, em heterozigose (Thr725Pro)

Exon 17: 2973G>T, em homozigose

Análise das novas alterações nos controles

Nenhuma das novas alterações de sequência foram identificadas em 100 indivíduos sem doença tireoideana.

Alinhamento da sequência de aminoácidos da TPO

Para verificar o grau de conservação dos aminoácidos alterados na TPO dos pacientes identificados, pela primeira vez neste estudo, foi comparada a sequência de aminoácidos da TPO humana (acesso # ENSG00000115705) com a das tireoperoxidasas das espécies: *Canis familiaris* (acesso # ENSCAFG00000003217), *Gallus* (acesso # ENSGALG00000016370), *Mus musculus* ENSMUSG00000020673, *Rattus norvegicus* (acesso # ENSRNOG00000004646), *Xenopus tropicalis* (acesso # ENSXETG00000006966).

Os aminoácidos glicina 319 e arginina 584, alterados nos pacientes com as mutações 1046G>A (Gly319Glu) e 1842 G>A (Aarg584Gln) estão conservados em todas as espécies estudadas e pertencem a uma região da proteína com alto grau de homologia entre elas. Os aminoácidos alterados pelas trocas 292C>A (Leu68Ile); 1367 C>G (Ala426Gly), 1942G>A (Val618Met), 2606 T>A (Cys838Ser), 2734C>T (Pro883Leu), apresentam grau variável de conservação entre as espécies estudadas, assim como a região protéica onde estão localizados (Figura 20).

a) 292C>T Leu68Ile (L68I)

TPO_paciente	NLK----	KRG	I	SPAQLLSFSKLP	PEPTSGVIARAAEIMETS
TPO_humana	NLK----	KRG	I	SPAQLLSFSKLP	PEPTSGVIARAAEIMETS
TPO_rat	NLK----	KRE	V	SPAQLLSFFKL	PESTSGAISRAAEIMETS
TPO_mouse	NLK----	KRE	V	SPAQLLSFFKL	PESTSGAISRAAEIMETS
TPO_canis	DL-----	KRG	L	SPSQLLSFSKLP	PESTRAVSRAAEIMEAS
TPO_gallus	NIQ----	DKG	L	SPTSLLA	FSKFPEQDSQDISQAAERMES
TPO_xenopus	KLKNLS	SEEG	L	-----	-----

b) 1046G>A Gly319Glu (G319E)

TPO_paciente	AACGTGDQ	GALF	GNL	STANPRQ	QMN	N	L	T	S	F	L	D	A	S	T	V	Y	G	S	S	P	A	L	E	R	Q	L	R	N	W	T	S	A	E	G	L	L	R	V	H									
TPO_humana	AACGTGDQ	GALF	GNL	STANPRQ	QMN	N	L	T	S	F	L	D	A	S	T	V	Y	G	S	S	P	A	L	E	R	Q	L	R	N	W	T	S	A	E	G	L	L	R	V	H									
TPO_rat	AACGTGDQ	GALF	GNL	SAANPRQ	QMN	N	L	T	S	F	L	D	A	S	T	V	Y	G	S	S	P	G	V	E	K	Q	L	R	N	W	S	S	A	G	L	L	R	V	N										
TPO_mouse	AACGTGDQ	GALF	GNL	SAANPRQ	QMN	N	L	T	S	F	L	D	A	S	T	V	Y	G	S	S	P	G	V	E	K	Q	L	R	N	W	S	S	A	G	L	L	R	V	N										
TPO_canis	AACGTGIQ	GAF	GNL	SSANPRQ	QMN	N	L	T	S	F	L	D	A	S	T	V	Y	G	S	S	P	A	L	E	K	Q	L	R	N	W	T	S	A	E	G	L	L	R	V	N									
TPO_gallus	-----	HS	I	L	F	GNL	S	A	L	N	P	R	Q	I	N	L	T	S	F	I	D	A	S	T	V	Y	G	S	T	S	T	V	E	N	K	L	R	N	L	T	S	E	E	G	L	L	R	V	N
TPO_xenopus	-----	LL	N	P	R	E	Q	I	N	L	T	S	F	I	D	A	S	T	V	Y	G	S	S	E	S	L	Q	H	K	L	N	L	S	S	E	E	G	L	L	R	V	N							

c) 1367C>G Ala426Gly (A426G)

TPO_paciente	HNRLAA	A	K	A	L	N	E	H	W	S	A	D	A	V	Y	Q	E	A	R	K	V	V	G	A	L	H	Q	I	I	T	L	R	D	-----															
TPO_human	HNRLAA	A	K	A	L	N	E	H	W	S	A	D	A	V	Y	Q	E	A	R	K	V	V	G	A	L	H	Q	I	I	T	L	R	D	-----															
TPO_rat	HNRLA	S	A	F	K	A	I	N	K	H	S	A	N	T	A	Y	Q	E	A	R	K	V	V	G	A	L	H	Q	I	I	T	M	R	D	Y	I	P	K	I	L	G	P	D	A	F	R	Q	Y	V
TPO_mouse	HNRLA	S	A	F	K	A	I	N	K	H	S	A	N	T	A	Y	Q	E	A	R	K	V	V	G	A	L	H	Q	I	I	T	M	R	D	Y	I	P	K	I	L	G	P	D	A	F	R	Q	Y	V
TPO_canis	HNRLA	S	A	L	K	A	L	N	E	H	S	A	D	T	A	Y	Q	E	A	R	K	V	V	G	A	L	H	Q	I	I	T	L	R	D	Y	V	P	K	V	L	G	P	E	A	F	Q	Q	H	V
TPO_gallus	HNRLA	R	A	L	K	A	I	N	K	H	S	A	E	T	V	Y	Q	E	A	R	K	I	V	G	A	L	H	Q	I	I	T	L	R	D	Y	I	P	K	I	L	G	P	D	A	F	N	Q	Y	I
TPO_xenopus	HNRI	A	K	A	L	K	L	N	P	H	W	S	E	T	T	Y	Q	E	A	R	K	I	V	G	A	L	H	Q	I	I	T	F	R	D	-----														

d) 1842G>A Arg584Gln (R584Q)

TPO_paciente	S	I	N	L	Q	R	G	R	D	H	G	L	P	G	Y	N	E	W	R	E	F	C	G	L	P	R	L	E	T	P	A	D	L	S	T	A	I	A	S	-----														
TPO_human	S	I	N	L	Q	R	G	R	D	H	G	L	P	G	Y	N	E	W	R	E	F	C	G	L	P	R	L	E	T	P	A	D	L	S	T	A	I	A	S	-----														
TPO_rat	S	I	N	L	Q	R	G	R	D	H	G	L	P	D	Y	N	E	W	R	E	F	C	G	L	S	R	L	E	T	P	A	E	L	N	K	A	I	A	N	R	S	M	V	N	K	I	M	D	L	Y	K	H	A	D
TPO_mouse	S	I	N	L	Q	R	G	R	D	H	G	L	P	D	Y	N	E	W	R	E	F	C	G	L	S	R	L	E	T	P	A	E	L	N	K	A	I	A	N	R	S	M	V	N	K	I	M	D	L	Y	K	H	A	D
TPO_cannis	S	I	N	L	Q	R	G	R	D	H	G	L	P	G	Y	N	A	W	R	E	F	C	G	L	G	R	L	H	T	R	A	E	L	S	A	V	A	N	A	T	I	A	G	R	I	M	D	L	Y	G	H	P	D	
TPO_gallus	S	I	N	L	Q	R	G	R	D	H	G	L	P	G	Y	N	D	W	R	E	F	C	D	L	P	R	L	E	T	Q	T	D	L	N	T	I	I	T	N	Q	V	T	E	K	I	M	E	L	Y	H	I	P	S	
TPO_xenopus	S	I	N	L	Q	R	G	R	D	H	G	L	P	G	Y	N	D	W	R	E	F	C	G	L	S	R	L	A	T	P	A	D	L	I	N	A	V	S	D	Q	K	L	V	A	K	M	I	A	L	Y	S	H	P	D

e) 1942G>A Val618Met (V618M)

TPO_paciente	A	D	L	S	T	A	I	A	S	R	S	V	A	D	K	I	L	D	L	Y	K	-----	H	P	D	N	I	D	V	W	L	G	G	L	A	E	N	F	L	P	R	A	R	T	G	P	L	F	A	C	L	I	G	K	Q	M
TPO_human	A	D	L	S	T	A	I	A	S	R	S	V	A	D	K	I	L	D	L	Y	K	-----	H	P	D	N	I	D	V	W	L	G	G	L	A	E	N	F	L	P	R	A	R	T	G	P	L	F	A	C	L	I	G	K	Q	M
TPO_rat	A	E	L	N	K	A	I	A	N	R	S	M	V	N	K	I	M	D	L	Y	K	-----	H	A	D	N	I	D	V	W	L	G	G	L	A	E	K	F	L	P	G	A	R	T	G	P	L	F	A	C	I	I	G	K	Q	M
TPO_mouse	A	E	L	N	K	A	I	A	N	R	S	M	V	N	K	I	M	D	L	Y	K	-----	H	A	D	N	I	D	V	W	L	G	G	L	A	E	K	F	L	P	G	A	R	T	G	P	L	F	A	C	I	I	G	K	Q	M
TPO_cannis	A	E	L	R	S	A	V	A	N	A	T	I	A	G	R	I	M	D	L	Y	G	-----	H	P	D	N	I	D	V	W	L	G	G	L	A	E	P	L	L	P	R	A	R	T	G	P	L	F	A	C	L	I	G	R	Q	M
TPO_gallus	T	D	L	N	T	I	I	T	N	Q	V	T	E	K	I	M	E	L	Y	H	-----	I	P	S	N	I	D	V	W	L	G	G	L	V	E	D	F	L	P	G	A	R	T	G	P	L	F	A	C	L	I	G	K	Q	M	
TPO_xenopus	R	D	Y	M	P	K	I	L	G	K	A	Y	D	Q	Y	I	G	L	Y	K	G	Y	N	Q	K	T	N	P	S	I	S	N	I	F	-----																					

f) 2738C>T Pro883Leu (P883L)

TPO_paciente	T	V	I	C	R	W	T	R	T	G	T	K	---	S	T	L	L	I	S	E	T	G	-----	G	---	G	T	-----																											
TPO_human	T	V	I	C	R	W	T	R	T	G	T	K	---	S	T	L	L	I	S	E	T	G	-----	G	---	G	T	-----	P	E	L	R	C	-----	G	-----	K	H	Q	A	V	G	---												
TPO_rat	I	V	I	C	R	W	T	H	A	D	K	K	---	A	T	L	P	I	T	E	R	-----	V	T	-----	T	Q	S	G	C	-----	R	-----	K	S	Q	G	R	G	---															
TPO_mouse	I	V	I	C	R	W	T	H	A	D	K	K	---	A	T	L	P	I	T	E	R	-----	V	T	-----	T	Q	S	G	C	-----	R	-----	K	S	Q	G	R	G	---															
TPO_cannis	T	L	V	C	R	W	A	H	A	G	R	K	---	A	S	L	S	I	A	E	L	G	-----	G	R	G	A	P	-----	P	G	R	G	A	-----	G	-----																		
TPO_gallus	Q	L	I	C	T	N	K	G	W	N	-	F	Q	A	P	V	C	I	D	I	N	E	C	-----	K	---	E	I	N	P	P	C	S	P	T	A	K	C	I	N	T	K	G	-----	S	Y	K	C	F	C	---				
TPO_xenopus	K	M	I	A	L	Y	S	H	P	D	N	I	D	V	W	D	F	L	P	G	A	R	T	G	P	L	F	A	C	L	I	G	K	---	Q	M	-----	Q	A	L	R	E	---	G	D	R	F	W	Y	E	N	N	I	F	---

g) 2815 G>A Ala909Thr (A909T)

TPO_paciente	-----	P	E	L	R	C	-----	G	-----	K	H	Q	A	V	G	---	T	S	P	Q	R	T	A	A	Q	D	S	E							
TPO_human	-----	P	E	L	R	C	-----	G	-----	K	H	Q	A	V	G	---	T	S	P	Q	R	A	A	Q	D	S	E								
TPO_rat	-----	T	Q	S	G	C	-----	R	-----	K	S	Q	G	R	G	---	I	S	P	H	K	A	A	Q	D	T	G								
TPO_mouse	-----	T	Q	S	G	C	-----	R	-----	K	S	Q	G	R	G	---	I	S	P	H	K	A	A	Q	D	T	G								
TPO_cannis	-----	P	G	R	G	A	-----	G	-----	Q	D	G	A	S	G	S	L	V	P	P	L	P	G	P	G	R	T	A							
TPO_gallus	N	P	P	C	S	P	T	A	K	C	I	N	T	K	G	-----	S	Y	K	C	F	C	---	T	E	P	Y	K	L	A	E	D	G	R	T
TPO_xenopus	-----	Q	A	L	R	E	-----	G	D	R	F	W	Y	E	N	N	N	I	F	---	T	K	I	Q	R	S	E	L	E	K	H	S			

Figura 20: Alinhamento da sequência de aminoácidos da TPO de diferentes espécies para verificar a conservação do aminoácido alterado, identificado nos pacientes com Hipotireoidismo Congênito deste estudo. Em cores variadas as análises dos aminoácidos homólogos entre as espécies e as não homólogos.

Análise da estrutura secundária da proteína *in silico*

A análise da estrutura secundária da TPO portadora das novas mutações através do programa PSIPRED indicou que as alterações Dupl10pb A909fsX49 junto com a 2815G>A Ala909Thr, ambas identificadas no mesmo alelo do paciente 69 com DP11, podem alterar discretamente a estrutura secundária do domínio intracelular da proteína, além de alterar a sequência de aminoácido da região C terminal da proteína e introduzir 49 aminoácido (figura 21).

Figura 21: Análise da estrutura secundária (Pred) de a) TPO portadora das mutações A909fsX49 e Ala909Thr b) TPO não mutada. H: *hélix*; C: *coil*, E β -*sheet*. Região destacada: possíveis alterações na estrutura secundária pela presença das mutações. Conf: confiabilidade: 0=baixo; 9=alto, aa: aminoácido.

A mutação Gly319Glu identificada em pacientes com DIIT também poderia provocar alteração da estrutura secundária da proteína (Figura 22). Não foi verificada alteração na estrutura secundária da TPO com as novas alterações Ala426Gly, Arg584Gln, Val618Met, Cys838Ser e Pro883Leu.

Figura 22: Análise da estrutura secundária (Pred) de a) TPO portadora das mutações Gly319Glu b) TPO não mutada. H: *hélix*; C: *coil*, E *β-sheet*. Região destacada: possíveis alterações na estrutura secundária pela presença das mutações. Conf: confiabilidade: 0=baixo; 9=alto, aa: aminoácido.

6. DISCUSSÃO

A principal causa genética das disormonogêneses são os defeitos no gene da tireoperoxidase (Rubio *et al.*, 2002). Este estudo visou identificar alterações genéticas no gene TPO em 34 pacientes brasileiros, todos oriundos de Minas Gerais, com HC diagnosticado no programa de Triagem Neonatal ou "Teste do pezinho". O teste de perclorato, realizado aos 3 anos de idade, permitiu identificar 13 pacientes com descarga total de incorporação de iodeto (>50%) (DIIT) e 21 com descarga parcial (25-50%) DIIP.

Poucos são os estudos que incluíram pacientes com DIIP (Santos *et al.*, 1999; Nascimento *et al.*, 2003; Kotani *et al.*, 2003) e muitos trabalhos não mencionam o tipo de defeito, devido à impossibilidade de realizar o teste com iodo radioativo por negativa dos pais das crianças (Umeki *et al.*, 2002).

Mutações no gene TPO

A atividade enzimática da TPO depende da conformação estrutural correta da proteína, da sua inserção na membrana apical e da presença do sítio catalítico ativo (codificado pelos exon 8, 9 e 10) (Ruf e Carayon, 2005). Consequentemente, três diferentes mecanismos podem alterar a atividade da enzima. Primeiro, mutações que causam mudanças no quadro de leitura (*frame shift*). Segundo, a troca de um aminoácido pode provocar modificações importantes da conformação espacial da proteína ou alterar a glicosilação,

fazendo com que a proteína incorretamente estruturada seja retida no retículo endoplasmático (Kuliawat *et al.*, 2005). Terceiro: a substituição de um aminoácido pode afetar a função da enzima sem alterar sua estrutura ou localização (Deladoey *et al.*, 2007).

A duplicação 1277GGCC no exon 8 (R396fsX76) foi identificada neste estudo em dois pacientes com DIIT (pacientes 48 e 61) (figura 23). Esta mutação foi detectada previamente em pacientes de duas famílias brasileiras com HC (DIIT) (Nascimento *et al.*, 2003) e em outras populações (Abramowicz *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 1999; Bakker *et al.*, 2000; Rivolta *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2005; Fugazola *et al.*, 2005; Avbelj *et al.*, 2007). A mutação leva ao aparecimento de um codon de terminação no exon 9 diminuindo drasticamente a atividade da TPO no tecido afetado (Abramowicz *et al.*, 1992). Estes resultados confirmam que a duplicação de 4 pares de bases GGCC é uma alteração muito freqüente e está associada a defeitos graves de produção de hormônio e ao hipotireodismo congênito severo.

A mutação 2068C>G, no exon 11, Gln660Gly (figura 23), foi detectada anteriormente em duas famílias brasileiras (Santos *et al.*, 1999) e em uma família de origem franco-canadense (Deladëy *et al.*, 2007). Estudos imunohistoquímicos mostraram que a proteína mutada se expressa e se localiza apropriadamente. Análises *in silico* sugeriram que a estrutura tridimensional da proteína mutada está conservada, porém com alterações eletrostáticas ao redor do sítio catalítico que poderiam afetar sua atividade (Deladoëy *et al.*, 2007). Estes resultados permitiriam explicar o déficit de atividade da TPO e o defeito de incorporação de iodeto dos pacientes

portadores da mutação deste estudo, que apresentaram valores de descarga de iodo de 48,2% (paciente 35) e 62% (paciente 202), próximos ao valor de corte dos grupo DIIT e DIIP, e similares aos já observados em estudo anterior (Nascimento *et al.*, 2003).

Figura 23: Alterações do gene TPO identificadas em pacientes com hipotireoidismo congênito. a) Esquema da proteína TPO humana; b) esquema do cDNA da TPO humana. Em destaque, os domínios protéicos: região heme oxidase (exons 5-12); sítio catalítico (exons 8-10); domínio de transmembrana (exon 15); domínio CCP; domínio EGF-like; regiões intra e extracelular da proteína. Em vermelho: mutações identificadas em pacientes com defeito total de incorporação de iodo (descarga >50%). Em preto: mutações identificadas em pacientes com defeito parcial de incorporação de iodo (descarga <50%). Em azul: mutação identificada em paciente com DIIT (descarga de perclorato: 62%) e DIIP (descarga de perclorato 48,2%). * novas alterações identificadas neste trabalho. (Deladoëy *et al.*, 2008).

A mutação 2083C>T, no exon 11, Arg665Trp (figura 23), identificada em paciente com DIIT (paciente 70) foi descrita por primeira vez pela Umeki *et al.* (2002). Esses pesquisadores demonstraram, através de estudos *in vitro*, que a

mutação impede a correta localização da TPO na membrana apical do tireócito, inibindo a síntese hormonal (Umeki *et al.*, 2004).

A mutação 2602 T>A no exon 14, Cys838Ser (figura 23), presente em paciente com DIIP (paciente 35), foi identificada anteriormente em família portuguesa (Rodrigues *et al.*, 2005). Esta alteração promove a troca de cisteína por serina (ambos aminoácidos polares neutro) na posição 838 da proteína. Esta alteração está localizada no domínio *EGF-like* da TPO altamente conservado, cuja característica é conter 6 cisteínas que formam pontes dissulfetos dentro do domínio. A perda de uma cisteína pode alterar a estrutura secundária da proteína (figura 23) e consequentemente a conformação tridimensional e/ou a atividade enzimática. Sete mutações associadas ao HC já foram detectadas no exon 14 (tabela 2).

Neste estudo também foram identificadas 8 novas alterações de sequência, sete que levam a troca de aminoácidos e uma duplicação de 10pb que altera o quadro de leitura. Nenhuma destas novas alterações foi detectada no genoma de 100 indivíduos controles.

Duas alterações foram detectadas no exon 11, em pacientes com DIIT; a 1046G>A (paciente 202) (Gly319Glu) que substitui a glicina (apolar) da posição 319 pelo ácido glutâmico (ácido), e a 1842G>A (paciente 70) (Arg584Gln) que substitui a arginina (básico) da posição 584 pela glutamina (neutro) (Figura 23). Ambas estão localizadas no sítio ativo da enzima (exons 8, 9 e 10), região altamente conservada entre diferentes espécies (Figura 23) (Ruf e Carayon, 2005). Análise *in silico* mostrou que a estrutura secundária da proteína poderia ser alterada pela presença do ácido glutâmico na posição 319, localizado em

região de ligação de íons de cálcio (resíduos 240, 321, 323, 325, 327 e 494) (<http://www.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P07202>). Sendo assim, as mutações Gly319Glu e Arg584Gln poderiam alterar a conformação da proteína, e/ou a função da enzima.

A nova alteração 1367C>G no exon 8 (Ala426Gly) (figura 23) leva à troca da alanina da posição 426 por uma glicina (ambos apolares) e foi identificada em paciente com DIIP (paciente 3). Apesar de estar localizada no sítio ativo da enzima, encontra-se em uma região do domínio cuja seqüência não é altamente conservada (Figura 23). Mesmo assim, esta troca de aminoácidos poderia alterar moderadamente a função da enzima.

O alinhamento da seqüência de aminoácidos completa das TPOs humana, suína, de rato e camundongo mostrou alto grau de homologia entre elas, exceto nas regiões N e C terminal (Ruf e Carayon, 2005). Neste estudo foi identificada a troca 292C>A (exon 4) (Leu68Ile) que substitui a leucina da posição 68 por isoleucina (ambos apolares) em paciente com DIIT (paciente 75) (Figura 23). Após sua síntese, a TPO sofre várias modificações pós-traducionais como glicosilação e ligação do grupo heme (Fayadat *et al.*, 1999). Em 2005, Le Fourn *et al.* após seqüenciar a porção N terminal da proteína purificada de tecido de tireóide humana, sugeriram que a TPO poderia sofrer mais uma modificação pós traducional, a clivagem do propeptídeo da porção N terminal. Estes pesquisadores também sugeriram que o dobramento correto da proteína dependeria desse propeptídeo. Embora não tenham sido localizados os sítios de clivagem na TPO humana é plausível pensar que alterações na região N terminal da proteína possam afetar sua atividade.

Na porção intracitoplasmática da proteína, foram encontradas 3 alterações de seqüência, todas no exon 16 (Figura 23). A troca 2738C>T (Pro883Leu) que substitui a prolina da posição 883 por leucina (ambos aminoácido apolares) foi identificada em paciente com DIIT (paciente 37). A substituição 2815G>A (Ala909Thr) e a duplicação de 10 pares de bases na posição 2863 (909fsX49) estavam presentes no mesmo paciente com DIIP (paciente 69). Foi possível demonstrar que ambas alterações localizavam-se no mesmo alelo e não definiam uma heterozigose composta (figura 23). A inserção de 10pb altera o quadro de leitura da região C terminal da proteína e introduz um novo sítio de terminação de tradução na região não codificadora do gene (3'UTR) adicionando 46 aminoácidos à proteína. Todas essas alterações, no domínio citoplasmático, poderiam modificar a estrutura terciária e/ou localização na membrana e, conseqüentemente diminuir a atividade e capacidade de síntese de hormônio tireoideano.

O defeito na atividade enzimática ou de localização da proteína TPO causado pelas novas alterações de seqüência só poderá ser confirmado através de estudos funcionais.

Freqüência das mutações no gene TPO

Foram identificadas alterações no gene TPO em 10 pacientes (27,8%) dos 34 incluídos neste estudo, 6 (40%) pacientes com DIIT e 4 (19%) pacientes com DIIP. Estes achados são concordantes com os resultados de estudos de que incluíram pacientes com defeitos total e parcial de incorporação de iodeto. Rodrigues *et al.* (2005) detectaram mutações em 24% (13/55) dos pacientes

portugueses. Embora não tenham realizado o teste de perclorato, pode ser inferido que incluíram crianças com ambos defeitos. Já Bakker *et al.* (2000) detectaram mutações em 44 das 45 crianças estudadas com DIIT, porém com descarga da perclorato >90%. Rivolta *et al.* (2003 e 2007) estudaram somente 14 crianças argentinas (descarga de perclorato >46%) e identificaram mutações em 7 delas. E Avbelj *et al.* (2007) identificaram mutações em 46% dos pacientes (não submetidos ao teste de perclorato). Duas considerações devem ser feitas para poder avaliar corretamente estes dados e explicar a discordância da frequência das mutações de TPO observada em outros estudos: 1- em alguns centros diagnósticos, como na Holanda, o teste de perclorato é realizado através de injeção endovenosa do perclorato, quanto que os pacientes brasileiros deste estudo receberam perclorato por via oral; 2- alguns estudos incluem pacientes com alta consaguinidade.

Mutações monoalélicas e bialélicas e no gene TPO

Considerando que as mutações no gene TPO possuem herança autossômica recessiva, esperava-se que os pacientes fossem homozigotos ou heterozigotos compostos para que houvesse defeito na atividade catalítica da TPO (Manglabruks *et al.*, 1991). Contudo, 60% (6/10) dos pacientes com mutações no gene TPO (3/6 com DTII e 3/4 com DPII) possuíam um único alelo mutado. A detecção de uma mutação monoalélica em paciente com HC por defeito de organificação vem sendo discutida e pesquisada por vários grupos. Bakker *et al.* (2000) identificaram em 9% dos pacientes, carregadores de mutações no gene TPO, um único alelo mutado; Avbelj *et al.* (2007)

identificaram 65% (13/20) e Rivolta *et al.* (2005) observaram 50% (4/14). Até o momento 12 diferentes mutações em heterozigose simples, foram descritas em pacientes afetados com DIIT (Fugazzola *et al.*, 2005).

Mutações em região promotora/regulatórias do gene TPO também poderiam estar envolvidas no defeito de organificação. Recentemente foram descritas alterações no promotor do gene CYP21, associado a deficiência da 21 hidroxilase), em heterozigose composta com mutações no gene estrutural. (Araújo *et al.*, 2007). Por esse motivo foi sequenciada a região promotora (2957 pares de bases) do gene TPO de todos os pacientes com mutação monoalélica e de alguns sem mutação na sequência codificante. Contudo, neste trabalho foram identificados somente polimorfismos.

Defeitos de organificação de iodeto também foram recentemente associados a mutações em genes que participam da síntese de peróxido de hidrogênio (DUOX2, DUOXA2) (Moreno *et al.*, 2002; Grasberger e Refetoff, 2006). Sendo assim, iniciou-se a pesquisa do gene DUOX2 em dois pacientes deste estudo (pacientes 3 e 48, DIIP e DIIT respectivamente). O seqüenciamento completo dos 33 exons deste gene indicou apenas a presença de polimorfismos. Ante estes resultados e como a frequência de mutações nesses genes é extremamente baixa (Rivolta *et al.*, 2007), decidiu-se que o estudo completo de DUOX2 e DUOXA2 em pacientes com defeito de organificação será realizado em projeto futuro.

Assim, o defeito de síntese dos pacientes com um único alelo da TPO mutado poderia ser explicado pela presença de expressão monoalélica no tecido tireoideano dos pacientes. Este mecanismo foi proposto por Fugazzola

et al. (2003), quando através do seqüenciamento de cDNA do tecido tireoideano, observaram que somente o alelo paterno portador da mutação (R693W) se expressava. Esta hipótese está amparada pelo estudo de Gimelbrant *et al.* (2007) que mostrou que a expressão monoalélica nos autossomos humanos é um evento frequente.

Finalmente, deve ser considerada a possibilidade da existência de uma segunda mutação nas regiões intrônicas; a existência de deleções não detectadas pelo sequenciamento, por exemplo quando é deletado um exon inteiro que não possui polimorfismos informativos; ou o envolvimento de outros genes que modulem a biossíntese dos hormônios tireoideanos.

Quanto a presença de mutações bialélicas no gene TPO, que explicariam o fenótipo dos pacientes, dois pacientes com DTII apresentaram mutações em homozigose (paciente 37 Pro883Leu; paciente 611277insGGCC). Um paciente com DTII e um com DPII (paciente 202, Gly319Glu/Gln660Gly e paciente 35, Gln660Gly/Cys838Ser, respectivamente) eram portadores de alterações em heterozigose composta.

As mutações do gene TPO nas famílias

Neste estudo foi possível estudar os pais de três pacientes.

Os pais do paciente 48, portador de uma única mutação (ins1277GGCC) em heterozigose, não eram portadores da mutação. Duas explicações poderiam ser dadas: a inserção pode ser uma mutação “de novo”, ou pode haver dúvida quanto à paternidade dos pais da criança, hipótese que ainda não pôde ser confirmada. A presença desta mutação em várias populações da

Europa (Itália, Eslovênia, Bósnia, Bélgica, Holanda, Portugal), Argentina e Brasil, permite hipotetizar a existência de uma origem comum da mutação (Abramowicz *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 1999; Bakker *et al.*, 2000; Rivolta *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2005; Fugazola *et al.*, 2005; Avbelj *et al.*, 2007); ou ainda pensar na existência de um “hot spot” mutacional.

Foi possível confirmar que o paciente 61, homozigoto para a inserção 1277GGCC, herdou um alelo mutado de cada progenitor, ambos heterozigotos para a mutação.

Finalmente o estudo do gene TPO dos familiares do paciente 70 mostrou que a mãe, que não apresentava hipotireoidismo (TSH 1,9 μ U/mL) era portadora das mesmas duas mutações no gene TPO (Arg584Gln e Arg665Trp), sugerindo que a paciente possui um único alelo mutado, com possível expressão monoalélica.

7- CONCLUSÕES

- Em pacientes com hipotireodismo congênito foram identificadas no gene TPO: 4 mutações já conhecidas e 8 novas alterações de seqüências que poderiam estar associadas às dishormonogenes.

- As mutações presentes no pacientes com DIIT e DIIP estavam localizadas ao longo de todo o gene, tanto no domínio extracelular como no intracelular.

- A localização das mutações na proteína não pôde ser correlacionada com o grau de incorporação de iodeto no paciente.

- Somente duas mutações foram identificadas em mais de um paciente, mostrando a heterogeneidade genotípica da doença nesta população.

- Foi verificada alta freqüência de mutações monoalélicas.

- Nesse estudo não foi possível fazer a correlação entre fenótipo e genótipo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abramowicz MJ, Duprez L, Parma J, Vassart G, Heinrichs C. Familial congenital hypothyroidism due to inactivating mutation of the thyrotropin receptor causing profound hypoplasia of the thyroid gland. *J Clin Invest.* 1997; 99(12): 3018-24.

Abramowicz MJ, Targovnik HM, Varela V, Cochaux P, Krawiec L, Pisarev MA, Propato FV, Juvenal G, Chester HA, Vassart G. Identification of a mutation in the coding sequence of the human thyroid peroxidase gene causing congenital goiter. *J Clin Invest.* 1992; 90: 1200-04.

Al Taji E, Biebermann H, Límanová Z, Hníková O, Zikmund J, Dame C, Grüters A, Lebl J, Krude H. Screening for mutations in transcription factors in a Czech cohort of 170 patients with congenital and early-onset hypothyroidism: identification of a novel PAX8 mutation in dominantly inherited early-onset non-autoimmune hypothyroidism. *Eur J Endocrinol.* 2007;156(5):521-9.

Ambrugger P, Stoeva I, Bieberman H, Torresani T, Leitner C, Grüters A. Novel mutations of the thyroid peroxidase gene in patients with permanent congenital hypothyroidism. *Eur J Endocrinol.* 2001; 145(1): 19-24.

Amendola E, De Luca P, Macchia PE, Terracciano D, Rosica A, Chiappetta G, Kimura S, Mansouri A, Affuso A, Arra C, Macchia V, Di Lauro R, De Felice M. A mouse model demonstrates a multigenic origin of congenital hypothyroidism. *Endocrinology*. 2005 146(12):5038-47.

Andersen HJ. Studies of hypothyroidism in children. *Acta Paediatr Suppl*. 1961; 50 (Suppl 125): 1-150.

Anker R, Steinbrueck T, Donis-Keller H. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human thyroid peroxidase (hTPO) locus. *Hum Mol Genet*. 1992;1(2):137.

Araújo RS, Mendonca BB, Barbosa AS, Lin CJ, Marcondes JA, Billerbeck AE, Bachega TA. Microconversion between CYP21A2 and CYP21A1P promoter regions causes the nonclassical form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(10):4028-34.

Avbelj M, Tahirovic H, Debeljak M, Kusekova M, Toromanovic A, Krzisnik C, Battelino T. High prevalence of thyroid peroxidase gene mutations in patients with thyroid dysmorphogenesis. *Eur J Endocrinol*. 2007; 156(5): 511-9.

Baker JR, Arscott P, Johnson J. An analysis of the structure and antigenicity of different forms of human thyroid peroxidase. *Thyroid*. 1994; 4(2): 173-8.

Bakker B, Bikker H, Hennekam RC, Lommen EJ, Schipper MG, Vulsma T, de Vijlder JJ. Maternal isodisomy for chromosome 2p causing severe congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(3):1164-8.

Bakker B, Bikker H, Vulsma T, de Randamie JS, Wiedijk BM, De Vijlder JJ. Two decades of screening for congenital hypothyroidism in the Netherlands: TPO gene mutations in total iodide organification defects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(10): 3708-12.

Banga JP, Mahadevan D, Barton GJ, Sutton BJ, Saldanha JW, Odell E, McGregor AM. Prediction of domain organisation and secondary structure of thyroid peroxidase, a human autoantigen involved in destructive thyroiditis. *FEBS Lett.* 1990; 266(1-2): 133-41.

Berry MJ, Banu L, Larsen PR. Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature.* 1991; 349(6308):438-40.

Biebermann H, Liesenkötter KP, Emeis M, Oblanden M, Grüters A. Severe congenital hypothyroidism due to a homozygous mutation of the betaTSH gene. *Pediatr Res.* 1999; 46(2): 170-3.

Bikker H, Baas F, De Vijlder JJ. Molecular analysis of mutated thyroid peroxidase detected in patients with total iodide organification defects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(2):649-53.

Bikker H, den Hartog MT, Baas F, Gons MH, Vulsma T, de Vijlder JJ. A 20-basepair duplication in the human thyroid peroxidase gene results in a total iodide organification defect and congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 79(1):248-52.

Bikker H, Vulsma T, Baas F, de Vijlder JJ. Identification of five novel inactivating mutations in the human thyroid peroxidase gene by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mutat.* 1995; 6(1):9-16.

Bikker H, Waelkens JJ, Bravenboer B, de Vijlder JJ. Congenital hypothyroidism caused by a premature termination signal in exon 10 of the human thyroid peroxidase gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81(6): 2076-9.

Björkman U, Ekholm R. Hydrogen peroxide generation and its regulation in FRTL-5 and porcine thyroid cells. *Endocrinology.* 1992;130(1):393-9.

Börgel K, Pohlenz J, Holzgreve W, Bramswig JH. Intrauterine therapy of goitrous hypothyroidism in a boy with a new compound heterozygous mutation (Y453D and C800R) in the thyroid peroxidase gene. A long-term follow-up. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193(3 Pt 1):857-8.

Braverman LE, Ingbar SH. Changes in thyroidal function during adaptation to large doses of iodide. *J Clin Invest.* 1963;42:1216-31

Brent GA. The molecular basis of thyroid hormone action. *N Engl J Med.* 1994;331(13):847-53. Review.

Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet.* 1991;48(1):137-44.

Burge CB. Modeling dependencies in pre-mRNA splicing signals. In: Salzberg S, Searls D, Kasif S, editors. *Computational Methods in Molecular Biology.* Amsterdam: Elsevier Science, 1998. p. 127-163.

Burrow GN, Fisher DA, Larsen PR. Maternal and fetal thyroid function. *N Engl J Med.* 1994;331(16):1072-8.

Cardoso LC, Figueiredo MDL, Domingos MG, Vaisman M, Carvalho DP. Sistema enzimático gerador de peróxido de hidrogênio - NADPH oxidase - na tireóide humana. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2000;44(4):352-7.

Castanet M, Park SM, Smith A, Bost M, Léger J, Lyonnet S, Pelet A, Czernichow P, Chatterjee K, Polak M. A novel loss-of-function mutation in

TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate. *Hum Mol Genet.* 2002;11(17):2051-9.

Castanet M, Polak M, Bonaïti-Pellié C, Lyonnet S, Czernichow P, Léger J; AFDPHE (Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant). Nineteen years of national screening for congenital hypothyroidism: familial cases with thyroid dysgenesis suggest the involvement of genetic factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(5):2009-14.

Cavalieri RR, Rapoport B. Impaired peripheral conversion of thyroxine to triiodothyronine. *Annu Rev Med* 1977;28: 57-65.

Cavalieri RR. Iodine metabolism and thyroid physiology: current concepts. *Thyroid.* 1997;7(2):177-81. Review.

Cetani F, Costagliola S, Tonacchera M, Panneels V, Vassart G, Ludgate M. The thyroperoxidase doublet is not produced by alternative splicing. *Mol Cell Endocrinol.* 1995;115(2):125-32.

Chanoine JP, Braverman LE, Farwell AP, Safran M, Alex S, Dubord S, Leonard JL. The thyroid gland is a major source of circulating T3 in the rat. *J Clin Invest.* 1993;91(6):2709-13.

Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P, Crisp MS, John R, Lazarus JH, Ludgate M, Chatterjee VK. Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat Genet.* 1998; 19(4):399-401.

Collu R, Tang J, Castagné J, Lagacé G, Masson N, Huot C, Deal C, Delvin E, Faccenda E, Eidne KA, Van Vliet G. A novel mechanism for isolated central hypothyroidism: inactivating mutations in the thyrotropin-releasing hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82(5):1561-5

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):3962-7.

Courtin F, Deme D, Virion A, Michot JL, Pommier J, Nunez J. The role of lactoperoxidase-H₂O₂ compounds in the catalysis of thyroglobulin iodination and thyroid hormone synthesis. *Eur J Biochem.* 1982;124(3):603-9.

Coyle B, Reardon W, Herbrick JA, Tsui LC, Gausden E, Lee J, Coffey R, Grueters A, Grossman A, Phelps PD, Luxon L, Kendall-Taylor P, Scherer SW, Trembath RC. Molecular analysis of the PDS gene in Pendred syndrome. *Hum Mol Genet.* 1998;7(7):1105-12.

Croteau W, Davey JC, Galton VA, St Germain DL. Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. *J Clin Invest.* 1996;98(2):405-17

Croteau W, Whittemore SL, Schneider MJ, St Germain DL. Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem.* 1995; 270(28):16569-75.

de Araújo MCK, da Silva MHB, Diniz EMA, Vaz FAC. A tireóide no feto e no recém-nascido: peculiaridades desfuncionais e principais doenças tireoidianas. *Pediatrics.* 2003; 25 (1/2): 51-60.

de Carvalho TM, dos Santos HP, dos Santos ICGP, Vargas PR, Pedrosa J. Newborn screening: A national public health programme in Brazil. *J Inher Metab Dis.* 2007; 30(4): 615.

De Deken X, Wang D, Dumont JE, Miot F. Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H₂O₂-generating system. *Exp Cell Res.* 2002;273(2):187-96.

De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE, Miot F. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem.* 2000;275(30):23227-33.

De Felice M, Di Lauro R. Thyroid Development and Its Disorders: Genetics and Molecular Mechanisms. *Endocr Rev.* 2004;25(5):722-46.

De La Vieja A, Dohan O, Levy O, Carrasco N. Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiol Rev.* 2000;80(3):1083-105.

De Vijlder JJM, Vulsma T, Ris-Stalpers C. Genetic defects in thyroid hormone supply. In: DeGroot LJ, Henneman G, editors. *Thyroid Manager*, electronic edition. 2003. www.thyroidmanager.org

De Vijlder JJM, Vulsma T. Hereditary metabolic disorders causing hypothyroidism. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. *Werner and Ingbar's The Thyroid*, 8th ed, part 1, ch 54. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 733-742.

Degroot LJ, Niepomniszcze H. Biosynthesis of thyroid hormone: basic and clinical aspects. *Metabolism.* 1977; 26(6):665-718.

Deladoëy J, Pfarr N, Vuissoz JM, Parma J, Vassart G, Biesterfeld S, Pohlenz J, Van Vliet G. Pseudodominant inheritance of goitrous congenital hypothyroidism caused by TPO mutations: molecular and in silico studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(2):627-33.

Delange F. Neonatal hypothyroidism: recent developments. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1988;2(3):637-52. Review

Delangue F, Czernishow P. Hypothyroidism. In: Becker LK, Bilezikian JP, Bremner WH, Hung W, editors. *Principles and practice of endocrinology and metabolism*, 3rd ed, ch 18. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 1990. p. 252-263.

Delangue F. Biochemistry and Physiology. In: Becker LK, Bilezikian JP, Bremner WH, editors. *Principles and practice of endocrinology and metabolism*, 3rd ed, ch 17. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers. 1990. p. 242-251.

Derwahl M, Seto P, Rapoport B. Complete nucleotide sequence of the cDNA for thyroid peroxidase in FRTL5 rat thyroid cells. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(20):8380.

Devos H, Rodd C, Gagné N, Laframboise R, Van Vliet G. A search for the possible molecular mechanisms of thyroid dysgenesis: sex ratios and associated malformations. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(7):2502-6.

Devriendt K, Vanhole C, Matthijs 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.

Di Cristofaro J, Silvy M, Lanteaume A, Marcy M, Carayon P, De Micco C. Expression of tpo mRNA in thyroid tumors: quantitative PCR analysis and correlation with alterations of ret, Braf, ras and pax8 genes. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13(2):485-95.

Doerge DR, Taurog A, Dorris ML. Evidence for a radical mechanism in peroxidase-catalyzed coupling. II. Single turnover experiments with horseradish peroxidase. *Arch Biochem Biophys*. 1994;315(1):90-9.

Dohán O, Carrasco N. Advances in Na⁽⁺⁾/I⁽⁻⁾ symporter (NIS) research in the thyroid and beyond. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;213(1):59-70. Review

Dull TJ, Uyeda C, Strosberg AD, Nedwin G, Seilhamer JJ. Molecular cloning of cDNAs encoding bovine and human lactoperoxidase. *DNA Cell Biol*. 1990;9(7):499-509.

Dumond JE, Vassart G, Rettoff S. Thyroid disorders. In: Scriver CR, Beaudt AL, Sly WS, Valle D, editors. *Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6th ed. New York: McGraw-Hill, 1989. p. 1843-1879.

Dunn AD, Crutchfield HE, Dunn JT. Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsins B, D, and L. J Biol Chem. 1991;266(30):20198-204.

Dunn JT, Dunn AD. Update on intrathyroidal iodine metabolism. Thyroid. 2001;11(5):407-14.

Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noël-Hudson MS, Dème D, Virion A. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. J Biol Chem. 1999;274(52):37265-9.

Dupuy C, Virion A, De Sandro V, Ohayon R, Kaniewski J, Pommier J, Dème D. Activation of the NADPH-dependent H₂O₂-generating system in pig thyroid particulate fraction by limited proteolysis and Zn²⁺ treatment. Biochem J. 1992; 283 (2):591-5.

Dussault C, Jouanin JC, Guezennec CY. EEG and ECG changes during selected flight sequences. Aviat Space Environ Med. 2004;75(10):889-97.

Ekholm R, Björkman U. Localization of iodine binding in the thyroid gland in vitro. Endocrinology. 1984;115(4):1558-67.

Ekholm R, Wollman SH. Site of iodination in the rat thyroid gland deduced from electron microscopic autoradiographs. *Endocrinology*. 1975;97(6):1432-44.

Endo Y, Onogi S, Umeki K, Yamamoto I, Kotani T, Ohtaki S, Fujita T. Regional localization of the gene for thyroid peroxidase to human chromosome 2p25 and mouse chromosome 12C. *Genomics*. 1995;25(3):760-1.

Esperante SA, Rivolta CM, Miravalle L, Herzovich V, Iorcansky S, Baralle M, Targovnik HM. Identification and characterization of four PAX8 rare sequence variants (p.T225M, p.L233L, p.G336S and p.A439A) in patients with congenital hypothyroidism and dysgenetic thyroid glands. *Clin Endocrinol*. 2008;68(5):828-35.

Everett LA, Glaser B, Beck JC, Idol JR, Buchs A, Heyman M, Adawi F, Hazani E, Nassir E, Baxevanis AD, Sheffield VC, Green ED. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet*. 1997;17(4):411-22.

Everett LA, Morsli H, Wu DK, Green ED. Expression pattern of the mouse ortholog of the Pendred's syndrome gene (Pds) suggests a key role for pendrin in the inner ear. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(17):9727-32.

Fayadat L, Niccoli-Sire P, Lanet J, Franc JL. Human thyroperoxidase is largely retained and rapidly degraded in the endoplasmic reticulum. Its N-glycans are required for folding and intracellular trafficking. *Endocrinology*. 1998;139(10):4277-85.

Fayadat L, Niccoli-Sire P, Lanet J, Franc JL. Role of heme in intracellular trafficking of thyroperoxidase and involvement of H₂O₂ generated at the apical surface of thyroid cells in autocatalytic covalent heme binding. *J Biol Chem*. 1999;274(15):10533-8.

Fayadat L, Siffroi-Fernandez S, Lanet J, Franc JL. Calnexin and calreticulin binding to human thyroperoxidase is required for its first folding step(s) but is not sufficient to promote efficient cell surface expression. *Endocrinology*. 2000;141(3):959-66.

Fayadat L, Siffroi-Fernandez S, Lanet J, Franc JL. Degradation of human thyroperoxidase in the endoplasmic reticulum involves two different pathways depending on the folding state of the protein. *J Biol Chem*. 2000;275(21):15948-54.

Ferrand M, Le Fourn V, Franc JL. Increasing diversity of human thyroperoxidase generated by alternative splicing. Characterized by molecular cloning of new transcripts with single- and multispliced mRNAs. *J Biol Chem*. 2003;278(6):3793-800.

Fisher DA. Euthyroid low thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) states in prematures and sick neonates. *Pediatr Clin North Am.* 1990; 37(6):1297-312.

Fisher DA. Thyroid function in premature infants. The hypothyroxinemia of prematurity. *Clin Perinatol.* 1998;25(4):999-1014, viii. Review.

Foley TP. Congenital hypothyroidism. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. *Werner and Ingbar's The Thyroid*, 8th ed, part 1, ch 4, Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins, 2000. p. 977-983.

Foley TP. Sporadic congenital hypothyroidism. In: Dussolt JH, Walker P, editors. *Congenital hypothyroidism*. New York: Marcel Dekker, 1983. p. 231-259.

Fugazzola L, Cerutti N, Mannavola D, Vannucchi G, Fallini C, Persani L, Beck-Peccoz P. Monoallelic expression of mutant thyroid peroxidase allele causing total iodide organification defect. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(7):3264-71.

Fugazzola L, Mannavola D, Vigone MC, Cirello V, Weber G, Beck-Peccoz P, Persani L. Total iodide organification defect: clinical and molecular characterization of an Italian family. *Thyroid.* 2005;15(9):1085-8.

Fujiwara H, Tatsumi K, Miki K, Harada T, Miyai K, Takai S, Amino N. Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na⁺/I⁻ symporter. *Nat Genet.* 1997;16(2):124-5.

Fujiwara H, Tatsumi K, Miki K, Harada T, Okada S, Nose O, Kodama S, Amino N. Recurrent T354P mutation of the Na⁺/I⁻ symporter in patients with iodide transport defect. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(8):2940-3.

Gavaret JM, Cahnmann HJ, Nunez J. Thyroid hormone synthesis in thyroglobulin. The mechanism of the coupling reaction. *J Biol Chem.* 1981;256(17):9167-73.

Gérard AC, Boucquey M, van den Hove MF, Colin IM. Expression of TPO and ThOXs in human thyrocytes is downregulated by IL-1 α /IFN- γ , an effect partially mediated by nitric oxide. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291(2):E242-53.

Gérard CM, Lefort A, Christophe D, Libert F, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G. Control of thyroperoxidase and thyroglobulin transcription by cAMP: evidence for distinct regulatory mechanisms. *Mol Endocrinol.* 1989;3(12):2110-8.

Gimelbrant A, Hutchinson JN, Thompson BR, Chess A. Widespread monoallelic expression on human autosomes. Widespread monoallelic expression on human autosomes. *Science*. 2007;318(5853):1136-40.

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

Grasberger H, Refetoff S. Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent. *J Biol Chem*. 2006;281(27):18269-72.

Greenspan FS. The thyroid gland. In: Greenspan FS, Gardner DV, editors. *Basic & Clinical endocrinology*, 7th ed, ch7. San Francisco: Lange Medical books/Mc. Graw Hill, 2004. p. 215-294.

Grennan Jones F, Wolstenholme A, Fowler S, Smith S, Ziemnicka K, Bradbury J, Furmaniak J, Rees Smith B. High-level expression of recombinant immunoreactive thyroid peroxidase in the High Five insect cell line. *J Mol Endocrinol*. 1996;17(2):165-74.

Gruters A. Congenital hypothyroidism. *Pediatr Ann.* 1992;21(1):15, 18-21, 24-8. Review.

Guazzi S, Price M, De Felice M, Damante G, Mattei MG, Di Lauro R. Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. *EMBO J.* 1990;9(11):3631-9.

Johnson KR, Nauseef WM, Care A, Wheelock MJ, Shane S, Hudson S, Koeffler HP, Selsted M, Miller C, Rovera G. Characterization of cDNA clones for human myeloperoxidase: predicted amino acid sequence and evidence for multiple mRNA species. *Nucleic Acids Res.* 1987;15(5):2013-28.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica.* 10a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

Kaufman KD, Rapoport B, Seto P, Chazenbalk GD, Magnusson RP. Generation of recombinant, enzymatically active human thyroid peroxidase and its recognition by antibodies in the sera of patients with Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Invest.* 1989;84(2):394-403.

Kavok NS, Krasilnikova OA, Babenko NA. Thyroxine signal transduction in liver cells involves phospholipase C and phospholipase D activation. Genomic independent action of thyroid hormone. *BMC Cell Biol.* 2001;2:5.

Kikkawa F, Gonzalez FJ, Kimura S. Characterization of a thyroid-specific enhancer located 5.5 kilobase pairs upstream of the human thyroid peroxidase gene. *Mol Cell Biol.* 1990;10(12):6216-24.

Kimura S, Hong YS, Kotani T, Ohtaki S, Kikkawa F. Structure of the human thyroid peroxidase gene: comparison and relationship to the human myeloperoxidase gene. *Biochemistry.* 1989;28(10):4481-9. a

Kimura S, Iwao H, Fukui K, Abe Y, Tanaka S. Effects of thyroid hormone on angiotensinogen and renin messenger RNA levels in rats. *Jpn J Pharmacol.* 1990;52(2):281-5.

Kimura S, Kotani T, McBride OW, Umeki K, Hirai K, Nakayama T, Ohtaki S. Human thyroid peroxidase: complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping, and identification of two alternately spliced mRNAs. *Proc Natl Acad Sci.* 1987;84(16):5555-9.

Kimura S, Kotani T, Ohtaki S, Aoyama T. cDNA-directed expression of human thyroid peroxidase. *FEBS Lett.* 1989;250(2):377-80. b

Kiser C, Caterina CK, Engler JA, Rahemtulla B, Rahemtulla F. Cloning and sequence analysis of the human salivary peroxidase-encoding cDNA. *Gene.* 1996;173(2):261-4.

Kiser CS, Rahemtulla F, Månsson-Rahemtulla B. Monolayer culture of rat parotid acinar cells without basement membrane substrates. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1990;26(9):878-88.

Klein AH, Meltzer S, Kenny FM. Improved prognosis in congenital hypothyroidism treated before age three months. *J Pediatr.* 1972;81(5):912-5.

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

Knobel M, Nogueira CR, Medeiros-Neto G. Genética Molecular do Hipotireoidismo Congênito. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2001; 45(1): 24-31.

Kok JH, Briet JM, van Wassenae AG. Postnatal thyroid hormone replacement in very preterm infants. *Semin Perinatol.* 2001;25(6):417-25. Review.

Kopp P. Pendred's syndrome and genetic defects in thyroid hormone synthesis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2000;1(1-2):109-21. Review.

Kopp P. Perspective: genetic defects in the etiology of congenital hypothyroidism. *Endocrinology.* 2002;143(6):2019-24. Review.

Kotani T, Ohtaki S. Characterization of thyroid follicular cell apical plasma membrane peroxidase using monoclonal antibody. *Endocrinol Jpn.* 1987;34(3):407-13.

Kotani T, Umeki K, Kawano J, Suganuma T, Hishinuma A, Ieiri T, Harada S. Partial iodide organification defect caused by a novel mutation of the thyroid peroxidase gene in three siblings. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003;59(2):198-206

Kotani T, Umeki K, Yamamoto I, Maesaka H, Tachibana K, Ohtaki S. A novel mutation in the human thyroid peroxidase gene resulting in a total iodide organification defect. *J Endocrinol.* 1999;160(2):267-73.

Kotani T, Umeki K, Yamamoto I, Takeuchi M, Takechi S, Nakayama T, Ohtaki S. Nucleotide sequence of the cDNA encoding mouse thyroid peroxidase. *Gene.* 1993;123(2):289-90.

Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet.* 1992;90(1-2):41-54.

Krude H, Biebermann H, Schnabel D, Ambrügger P, Grüters A. Molecular pathogenesis of neonatal hypothyroidism. *Horm Res.* 2000;53 Suppl 1:12-8.

Kuliawat R, Ramos-Castañeda J, Liu Y, Arvan P. Intracellular trafficking of thyroid peroxidase to the cell surface. *J Biol Chem*. 2005;280(30):27713-8.

La Franchi S. Disorders of the thyroid gland. In: Behrman RE, Liegman R, Jenson HB. *Nelson textbook of pediatrics*, 8th ed. section 2, ch 573-574. USA: W. B.Saunders, 2000. p. 1696-1703.

La Franchi S. Thyroid function in the preterm infant. *Thyroid*; 1999;9:71-8.

Larsen PR, Davies TF, Schlumberger MJ, Hay ID. Thyroid physiology and diagnostic evaluation of patients with thyroid disorders. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, editors. *Williams' textbook of endocrinology*. 10th ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 2003.p.331-73.

Le Fourn V, Ferrand M, Franc JL. Endoproteolytic cleavage of human thyroperoxidase: role of the propeptide in the protein folding process. *J Biol Chem*. 2005;280(6):4568-77.

Leseney AM, Dème D, Dupuy C, Ohayon R, Chanson P, Sales JP, et al. Biochemical characterization of a Ca^{2+} /NAD(P)H-dependent H_2O_2 generator in human thyroid tissue. *Biochimie* 1999;81:373-80.

Levy O, Dai G, Riedel C, Ginter CS, Paul EM, Lebowitz AN, Carrasco N. Characterization of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(11):5568-73.

Libert F, Ruel J, Ludgate M, Swillens S, Alexander N, Vassart G, Dinsart C. Complete nucleotide sequence of the human thyroperoxidase-microsomal antigen cDNA. *Nucleic Acids Res*. 1987;15(16):6735. a

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

Loeber JG. Neonatal screening in Europe; the situation in 2004. *J Inherit Metab Dis*. 2007;30(4):430-8.

Lomenick JP, El-Sayyid M, Smith WJ. Effect of levo-thyroxine treatment on weight and body mass index in children with acquired hypothyroidism. *J Pediatr*. 2008;152(1):96-100.

Magnusson RP, Gestautas J, Seto P, Taurog A, Rapoport B. Isolation and characterization of a cDNA clone for porcine thyroid peroxidase. *FEBS Lett*. 1986;208(2):391-6.

Magnusson RP, Gestautas J, Taurog A, Rapoport B. Molecular cloning of the structural gene for porcine thyroid peroxidase. *J Biol Chem.* 1987; 262(29):13885-8.

Manglabruks A, Billerbeck AE, Wajchenberg B, Knobel M, Cox NJ, DeGroot LJ, Medeiros-Neto G. Genetic linkage studies of thyroid peroxidase (TPO) gene in families with TPO deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;72(2):471-6.

Maruo Y, Takahashi H, Ikumi S, Nishikura N, Matsui K, Ota Y, Mimura Y, Mori A, Sato H, Takeuchi Y. Transient congenital hypothyroidism caused by biallelic mutations of the dual oxidase 2 (DUOX2) gene in Japanese patients detected by a neonatal screening program. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008. [Epub ahead of print]

McLachlan SM, Rapoport B. Autoimmune response to the thyroid in humans: thyroid peroxidase--the common autoantigenic denominator. *Int Rev Immunol.* 2000;19(6):587-618. Review

McLachlan SM, Rapoport B. Thyroid peroxidase as an autoantigen. *Thyroid.* 2007;17(10):939-48.

Medeiros Neto GA. Fisiologia da glândula tireóide no período fetal, na infância e na adolescência. In: Setian N. *Endocrinologia pediátrica: aspectos*

físicos e metabólicos do recém-nascido ao adolescente. São Paulo: Savier, 2002. p. 255-9.

Medeiros-Neto G, Gil-Da-Costa MJ, Santos CL, Medina AM, Silva JC, Tsou RM, Sobrinho-Simões M. Metastatic thyroid carcinoma arising from congenital goiter due to mutation in the thyroperoxidase gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(11):4162-6.

Medeiros-Neto G, Herodotou DT, Rajan S, Kommareddi S, de Lacerda L, Sandrini R, Boguszewski MC, Hollenberg AN, Radovick S, Wondisford FE. A circulating, biologically inactive thyrotropin caused by a mutation in the beta subunit gene. *J Clin Invest.* 1996;97(5):1250-6.

Medeiros-Neto GA, Billerbeck AE, Wajchenberg BL, Targovnik HM. Defective organification of iodide causing hereditary goitrous hypothyroidism. *Thyroid.* 1993;3(2):143-59.

Medeiros-Neto GA, Marcondes JA, Cavaliere H, Wajchenberg BL, Knobel M. Serum thyroglobulin (Tg) stimulation with bovine TSH: a useful test for diagnosis of congenital goitrous hypothyroidism due to defective Tg synthesis. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1985;110(1):61-5

Medeiros-Neto GA. Hipotireoidismo Congênito no Brasil, como era, como estamos para onde vamos. Ed Geraldo Medeiros – Neto 2004.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.

Ministério da Saúde. Portaria no. 822, 6 de julho de 2001. Instituição no âmbito do Sistema Único de Saúde do Programa Nacional de Triagem Neonatal, 2001. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/sas/portarias.htm>. Acessado em 13 de fevereiro de 2006.

Moore, KL. Fundamentos de anatomia clínica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 501.

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

Moreno JC, Klotwijk W, van Toor H, Pinto G, D'Alessandro M, Lèger A, Goudie D, Polak M, Grüters A, Visser TJ. Mutations in the iodotyrosine deiodinase gene and hypothyroidism. *N Engl J Med.* 2008;358(17):1811-8.

Moreno JC, Visser TJ. New phenotypes in thyroid dysharmonogenesis: Mount SM. A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res.* 1982;10(2):459-72.

Moreno JC, Visser TJ. New phenotypes in thyroid dysharmonogenesis: hypothyroidism due to DUOX2 mutations. *Endocr Dev.* 2007;10:99-117.

Moura Neto V, Trentin A, Lima F, Gomes F, Gonçalves N, Chamas LV, Lins C, Garcia-Abreu J, Rosenthal D, Chagas C. Effects [correction of Effects] of the thyroid hormone (T3) on astrocytes. *Rev Bras Biol.* 1996; 56 (Su 1 Pt 1):123-34.

Moura-Neto R, Dudov KP, Perry RP. An element downstream of the cap site is required for transcription of the gene encoding mouse ribosomal protein L32. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(11):3997-4001.

Nagataki S, Uchimura H, Masuyama Y, Nakao K. Thyrotropin and thyroidal peroxidase activity. *Endocrinology.* 1973;92(2):363-71.

Nagayama Y, Seto P, Rapoport B. Characterization, by molecular cloning, of smaller forms of thyroid peroxidase messenger ribonucleic acid in human thyroid cells as alternatively spliced transcripts. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;71(2):384-90.

Nagayama Y, Yamashita S, Hirayu H, Izumi M, Uga T, Ishikawa N, Ito K, Nagataki S. Regulation of thyroid peroxidase and thyroglobulin gene expression by thyrotropin in cultured human thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989;68(6):1155-9.

Nakamura Y, Ohtaki S, Makino R, Tanaka T, Ishimura Y. Superoxide anion is the initial product in the hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in porcine thyroid plasma membrane. *J Biol Chem.* 1989;264(9):4759-61.

Nascimento AC, Guedes DR, Santos CS, Knobel M, Rubio IG, Medeiros-Neto G. Thyroperoxidase gene mutations in congenital goitrous hypothyroidism with total and partial iodide organification defect. *Thyroid.* 2003;13(12):1145-51.

Nascimento AC, Zanotta LC, Kyaw CM, Schwartz EN, Schwartz CA, Sebben A, Sousa MV, Fontes W, Castro MS. Ocellatins: new antimicrobial peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). *Protein J.* 2004;23(8):501-8.

New England Congenital Hypothyroidism Collaborative. Characteristics of infantile hypothyroidism discovered on neonatal screening. *J Pediatr.* 1984;104(4):539-44.

New England Congenital Hypothyroidism Collaborative. Correlation of cognitive test scores and adequacy of treatment in adolescents with congenital hypothyroidism. *J Pediatr*. 1994; 124(3):383-7.

Nishikawa T, Rapoport B, McLachlan SM. Exclusion of two major areas on thyroid peroxidase from the immunodominant region containing the conformational epitopes recognized by human autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79(6):1648-54.

Niu DM, Hwang B, Chu YK, Liao CJ, Wang PL, Lin CY. High prevalence of a novel mutation (2268 insT) of the thyroid peroxidase gene in Taiwanese patients with total iodide organification defect, and evidence for a founder effect. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87(9):4208-12.

Ohtaki S, Kotani T, Nakamura Y. Characterization of human thyroid peroxidase purified by monoclonal antibody-assisted chromatography. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986;63(3):570-6.

Ohtaki S, Nakagawa H, Kimura S, Yamazaki I. Analyses of catalytic intermediates of hog thyroid peroxidase during its iodinating reaction. *J Biol Chem*. 1981;256(2):805-10.

Ohye H, Fukata S, Hishinuma A, Kudo T, Nishihara E, Ito M, Kubota S, Amino N, Ieiri T, Kuma K, Miyauchi A. A novel homozygous missense

mutation of the dual oxidase 2 (DUOX2) gene in an adult patient with large goiter. *Thyroid*. 2008;18(5):561-6.

O'Neill B, Magnolato D, Semenza G. The electrogenic, Na⁺- dependent I- transport system in plasma membrane vesicles from thyroid glands. *Biochim Biophys Acta*. 1987;896(2):263-74.

Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 1989;5(4):874-9.

Osório RV, Vilarinho L, Soares PJ. Programa Nacional de Diagnóstico Precoce: 20 anos de rastreio neonatal. *Arq Med*. 1999; 13: 163-8.

Pannain S, Weiss RE, Jackson CE, Dian D, Beck JC, Sheffield VC, Cox N, Refetoff S. Two different mutations in the thyroid peroxidase gene of a large inbred Amish kindred: power and limits of homozygosity mapping. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(3):1061-71.

Pardo V, Rubio IG, Knobel M, Aguiar-Oliveira MH, Santos MM, Gomes SA, Oliveira CR, Targovnik HM, Medeiros-Neto G. Phenotypic variation among four family members with congenital hypothyroidism caused by two distinct thyroglobulin gene mutations. *Thyroid*. 2008;18(7):783-6.

Pfarr N, Borck G, Turk A, Napióntek U, Keilmann A, Müller-Forell W, Kopp P, Pohlenz J. Goitrous congenital hypothyroidism and hearing impairment associated with mutations in the TPO and SLC26A4/PDS genes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(7):2678-81. b

Pfarr N, Korsch E, Kaspers S, Herbst A, Stach A, Zimmer C, Pohlenz J. Congenital hypothyroidism caused by new mutations in the thyroid oxidase 2 (THOX2) gene. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 65(6):810-5. a

Plachov D, Chowdhury K, Walther C, Simon D, Guenet JL, Gruss P. Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development.* 1990;110(2):643-51.

Pohlenz J, Rosenthal IM, Weiss RE, Jhiang SM, Burant C, Refetoff S. Congenital hypothyroidism due to mutations in the sodium/iodide symporter. Identification of a nonsense mutation producing a downstream cryptic 3' splice site. *J Clin Invest.* 1998; 101(5):1028-35.

Poulos TL. Heme enzyme crystal structures. *Adv Inorg Biochem.* 1988;7:1-36. Review.

Rawitch AB, Pollock G, Yang SX, Taurog A. Thyroid peroxidase glycosylation: the location and nature of the N-linked oligosaccharide units in porcine thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys.* 1992; 297(2):321-7.

Rawitch AB, Taurog A, Chernoff SB, Dorris ML. Hog thyroid peroxidase: physical, chemical, and catalytic properties of the highly purified enzyme. *Arch Biochem Biophys*. 1979;194(1):244-57.

Rivolta CM, Esperante SA, Gruñeiro-Papendieck L, Chiesa A, Moya CM, Domené S, Varela V, Targovnik HM. Five novel inactivating mutations in the thyroid peroxidase gene responsible for congenital goiter and iodide organification defect. *Hum Mutat*. 2003;22(3):259.

Rivolta CM, Louis-Tisserand M, Varela V, Gruñeiro-Papendieck L, Chiesa A, González-Sarmiento R, Targovnik HM. Two compound heterozygous mutations (c.215delA/c.2422T-->C and c.387delC/c.1159G-->A) in the thyroid peroxidase gene responsible for congenital goitre and iodide organification defect. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;67(2):238-46.

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

Roberts HE, Moore CA, Fernhoff PM, Brown AL, Khoury MJ. Population study of congenital hypothyroidism and associated birth defects, Atlanta, 1979-1992. *Am J Med Genet*. 1997;71(1):29-32.

Rodrigues C, Jorge P, Soares JP, Santos I, Salomão R, Madeira M, Osório RV, Santos R. Mutation screening of the thyroid peroxidase gene in a cohort of 55 Portuguese patients with congenital hypothyroidism. *Eur J Endocrinol.* 2005;152(2):193-8.

Rodriguez AM, Perron B, Lacroix L, Caillou B, Leblanc G, Schlumberger M, Bidart JM, Pourcher T. Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(7):3500-3.

Rosenberg IN, Goswami A. Purification and characterization of a flavoprotein from bovine thyroid with iodotyrosine deiodinase activity. *J Biol Chem.* 1979;254(24):12318-25.

Rubió IGS, Medeiros-Neto G. Hipotireoidismo Congênito: Recentes Avanços em Genética Molecular. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002; 46(4): 391-401.

Ruf J, Carayon P. Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys.* 2006;445(2):269-77.

Sakamaki K, Tomonaga M, Tsukui K, Nagata S. Molecular cloning and characterization of a chromosomal gene for human eosinophil peroxidase. *J Biol Chem.* 1989;264(28):16828-36.

Santos CL, Bikker H, Rego KG, Nascimento AC, Tambascia M, De Vijlder JJ, Medeiros-Neto G. A novel mutation in the TPO gene in goitrous hypothyroid patients with iodide organification defect. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999;51(2):165-72.

Santos SM, Budowle B, Smerick JB, Keys KM, Moretti TR. Portuguese population data on the six short tandem repeat loci--CSF1PO, TPOX, THO1, D3S1358, VWA and FGA. *Forensic Sci Int*. 1996;83(3):229-35.

Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res*. 1987;15(17):7155-74.

Solis JC, Valverde C. Neonatal hypothyroidism. pathophysiogenic, molecular and clinical aspects. *Rev Invest Clin*. 2006; 58(4):318-34.

Suzuki K, Lavaroni S, Mori A, Ohta M, Saito J, Pietrarelli M, Singer DS, Kimura S, Katoh R, Kawaoi A, Kohn LD. Autoregulation of thyroid-specific gene transcription by thyroglobulin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(14):8251-6.

Szinnai G, Lacroix L, Carré A, Guimiot F, Talbot M, Martinovic J, Delezoide AL, Vekemans M, Michiels S, Caillou B, Schlumberger M, Bidart JM, Polak M. Sodium/iodide symporter (NIS) gene expression is the limiting step for the

onset of thyroid function in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(1):70-6.

Tajima T, Tsubaki J, Fujieda K. Two novel mutations in the thyroid peroxidase gene with goitrous hypothyroidism. *Endocr J.* 2005; 52(5):643-5.

Taurog A, Dorris M, Doerge DR. Evidence for a radical mechanism in peroxidase-catalyzed coupling. Steady-state experiments with various peroxidases. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 315(1):82-9.

Taurog A, Dorris ML, Doerge DR. Mechanism of simultaneous iodination and coupling catalyzed by thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys.* 1996;330(1):24-32.

Taurog A, Dorris ML. Peroxidase-catalyzed bromination of tyrosine, thyroglobulin, and bovine serum albumin: comparison of thyroid peroxidase and lactoperoxidase. *Arch Biochem Biophys.* 1991;287(2):288-96.

Taurog A. Hormone synthesis: thyroid iodine metabolism. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. *Werner and Ingbar's The Thyroid*, 8th ed, part 1, ch 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 52-85.

Taurog A. The biosynthesis of thyroxine. *Mayo Clin Proc.* 1964; 39: 569-85.

Taurog A. Thyroid hormone synthesis. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. The thyroid: A fundamental and clinical text, 8th ed. New York: Lippincott-Raven, 2000. p. 85 - 91.

Tenenbaum-Rakover Y, Mamasiri S, Ris-Stalpers C, German A, Sack J, Allon-Shalev S, Pohlenz J, Refetoff S. Clinical and genetic characteristics of congenital hypothyroidism due to mutations in the thyroid peroxidase (TPO) gene in Israelis. Clin Endocrinol (Oxf). 2007;66(5):695-702.

Tice LW, Wollman SH. Ultrastructural localization of peroxidase on pseudopods and other structures of the typical thyroid epithelial cell. Endocrinology. 1974;94(6):1555-67.

Trotta E A. Síndrome do doente eutireoideano em crianças com sepse ou síndrome séptica. [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1991.

Umeki K, Kawano J, Yamamoto I, Aratake Y, Kotani T. Comparative analysis and characterization of mutated thyroid peroxidases with disturbance expressed on the cell surface. Mol Cell Endocrinol. 2004;223(1-2):77-84.

Umeki K, Kotani T, Kawano J, Suganuma T, Yamamoto I, Aratake Y, Furujo M, Ichiba Y. Two novel missense mutations in the thyroid peroxidase gene,

R665W and G771R, result in a localization defect and cause congenital hypothyroidism. *Eur J Endocrinol*. 2002;146(4):491-8.

Vaisman M, Resenthal D, Carvalho DP. Enzimas envolvidas na organificação tireoideana do iodo. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004; 48(1): 9-15.

Varela V, Rivolta CM, Esperante SA, Gruneiro-Papendieck L, Chiesa A, Targovnik HM. Three mutations (p.Q36H, p.G418fsX482, and g.IVS19-2A>C) in the dual oxidase 2 gene responsible for congenital goiter and iodide organification defect. *Clin Chem*. 2006;52(2):182-91.

Verhoeven AJ, Kamer P, Groen AK, Tager JM. Effects of thyroid hormone on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochem J*. 1985; 226(1):183-92.

Vigone MC, Fugazzola L, Zamproni I, Passoni A, Di Candia S, Chiumello G, Persani L, Weber G. Persistent mild hypothyroidism associated with novel sequence variants of the DUOX2 gene in two siblings. *Hum Mutat*. 2005; 26(4):395.

Vulsma T, Gons MH, de Vijlder JJ. Maternal-fetal transfer of thyroxine in congenital hypothyroidism due to a total organification defect or thyroid agenesis. *N Engl J Med*. 1989;321(1):13-6.

Wang C, Eufemi M, Turano C, Giartosio A. Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. *Biochemistry*. 1996;35(23):7299-307.

Whitley JR, Meikle AW, Watts NW. Thyroid function. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. *Fundamentals of clinical chemistry*, 4th ed, ch 34. Philadelphia: W. B.Sanders Company, 1996. pp 617-628.

Wolff J, Chaikoff IL. Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. *J Biol Chem*. 1944;174:555-64.

Wu JY, Shu SG, Yang CF, Lee CC, Tsai FJ. Mutation analysis of thyroid peroxidase gene in Chinese patients with total iodide organification defect: identification of five novel mutations. *J Endocrinol*. 2002;172(3):627-35.

Xie J, Pannain S, Pohlenz J, Weiss RE, Moltz K, Morlot M, Asteria C, Persani L, Beck-Peccoz P, Parma J, Vassart G, Refetoff S. Resistance to thyrotropin (TSH) in three families is not associated with mutations in the TSH receptor or TSH. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82(12):3933-40.

Yokoyama N, Taurog A. Porcine thyroid peroxidase: relationship between the native enzyme and an active, highly purified tryptic fragment. *Mol Endocrinol*. 1988;2(9):838-44.

Zamproni I, Grasberger H, Cortinovis F, Vigone MC, Chiumello G, Mora S, Onigata K, Fugazzola L, Refetoff S, Persani L, Weber G. Biallelic inactivation of the dual oxidase maturation factor 2 (DUOXA2) gene as a novel cause of congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(2):605-10

Zanelli E, Henry M, Charvet B, Malthiery Y. Evidence for an alternate splicing in the thyroperoxidase messenger from patients with Graves' disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;170(2):735-41.

Zannini M, Avantaggiato V, Biffali E, Arnone MI, Sato K, Pischetola M, Taylor BA, Phillips SJ, Simeone A, Di Lauro R. TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *EMBO J.* 1997; 16(11):3185-97.

Zeng J, Fenna RE. X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. *J Mol Biol.* 1992;226(1):185-207.