Paola Rossi Mezalira

Rastreamento e estudo funcional de alterações no gene da tireoperoxidase associadas ao hipotireoidismo congênito com defeito parcial de incorporação de iodeto

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina
Da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Antônio de Medeiros Neto

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Mezalira, Paola Rossi
Rastreamento e estudo funcional de alterações no gene da tireoperoxidase associadas ao hipotireoidismo congênito com defeito parcial de incorporação de iodeto / Paola Rossi Mezalira. -- São Paulo, 2010.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.
Orientador: Geraldo Antônio de Medeiros-Neto.

Descritores: 1.Hipotireoidismo congênito 2.Iodeto peroxidase 3.Mutação 4.Tireóide

USP/FM/DBD-480/10

Dedico este trabalho

Ao meu marido e companheiro Denis

Dedico esta dissertação a minha amada família:

Gilmar, Celia, Aline, Davi, Caio e Giulia.

Agradeço imensamente por todo amor e apoio de vocês. Nesses momentos, percebemos o quanto é importante contar com pessoas queridas, nos apoiando, nos dando força e coragem para continuar.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que compartilharam momentos comigo. Essas pessoas me transformaram no que sou hoje. E agradeço, principalmente as pessoas que dividiram momentos e angústias durante a execução deste estudo.

Ao longo deste trabalho, tive excelentes professores, grandes colegas de laboratório, que hoje considero amigos.

Em primeiro lugar, agradeço ao meu querido orientador, Dr. Geraldo. Não sei como agradecê-lo por todas as oportunidades e conhecimento que o senhor me proporcionou.

Agradeço em especial a Dra. Ileana, que me ensinou a ser uma pesquisadora, me incentivando nos momentos de desespero, rindo nos momentos de conquistas...Ile, muito Obrigada por tudo!!!

Minha família querida, nada disso seria possível se não fosse o apoio e carinho de vocês. Gilmar e Celia, meus pais, que sempre me incentivaram a estudar e me ensinaram a admirar o “aprender”. Meus irmãos, Aline, Davi e Caio, por toda a amizade e carinho.

Agradeço, de coração, ao meu marido, Denis, que sempre me incentivou, acreditou no meu potencial. Muito obrigada, meu amor. Sem seu apoio e sua paciência, nada disso seria possível. Agradeço a minha afilhada querida, Giulia, por trazer tanta alegria para minha vida.

Agradeço também a minha família, meus avos, tios e primos por todo carinho e amizade. Em especial, a minha tia Lia, pelo companheirismo, amizade e carinho.

Não poderia deixar de agradecer as “Chicas da Tireóide”, Viviane, Ana Luiza, Solange, Erika, Ester e Roberta, por todos os momentos que passamos juntas no laboratório.

Gostaria de agradecer também os colaboradores desta dissertação, Dra Denise Carvalho, Dr Peter Koop, Dra Bikker e Dr Hector Targoniv.

Agradeço também a todos meus amigos da Santa, especialmente as meninas, Fernanda, Josélia, Suely, Vera, Natalia e Aretusa, por todo apoio e carinho. Também não poderia deixar de agradecer ao Henrique, por continuar me mostrando o brilho de ser pesquisadora.

Agradeço a todos do LIM-25, pela amizade e ajuda em todos os momentos.

Agradeço ainda a todos os integrantes do grupo de Endocrinologia do HC.

Agradeço ainda a todos os colaboradores e pessoas que acreditaram em mim e no meu trabalho.

Um agradecimento que não poderia deixar de fazer é a Deus, por me proporcionar momentos tão importantes na minha vida, com muita saúde, perseverança e humildade.

Ninguém quer saber o que fomos, o que possuíamos, que cargo ocupávamos no mundo; o que conta é a luz que cada um já tenha conseguido fazer brilhar em si mesmo.

Chico Xavier

A auto-satisfação é inimiga do estudo. Se queremos realmente aprender alguma coisa, devemos começar por libertar-nos disso. Em relação a nós próprios devemos ser 'insaciáveis na aprendizagem' e em relação aos outros, 'insaciáveis no ensino'.

Mao Tse-Tung

Esta dissertação 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 AL Freddi, Maria F Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª. Edição 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

A tireóide …… 1

Anatomia e função 2

Biossíntese dos hormônios tireoideanos 4

A tireoperoxidase 7

Hipotireoidismo Congênito..... 11

Mutações gênicas associadas às disorhomonegenes..... 13

Mutações no sistema gerador de peróxido de hidrogênio DUOX..... 17

Mutações no gene da Tireoperoxidase..... 18

2. OBJETIVO 22

3. MATERIAL E MÉTODOS 23

Pacientes 23

Avaliação da função tireóidea ..…… 24

Teste de perclorato ……. 24

Extração de DNA …… 25

Quantificação de DNA …… 25

Amplificação do gene TPO por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)..... 25

Amplificação do gene DUOX2..... 29

Amplificação do gene DUOXA2..... 30

Sequenciamento ……... 30

Quantificação da expressão gênica por RT-PCR quantitativo …..... 31

Construção dos plasmídios pTPO-95G e pTPO-95T …… 32

A mutação Q660E ……... 34

Construção dos plasmídios pTPO e pTPO660 …… 34

Transformação de Bactérias por Eletroporação …….. 36

Extração de DNA Plasmídial - “Mini-Prep” ……... 38
Extração de DNA Plasmídial - "Midi-Prep" ……..... 39
Cultura de Células …… 39
Transfecção de célula de mamífero …….. 40
Células estabilizadas …… 40
Extração de RNA …….. 41
Síntese de cDNA ……..… 42
Avaliação da atividade da Tireoperoxidase..... 43
Teste para avaliação de atividade de luciferase..…… 45
Análise estatística.....…… 46
4. RESULTADOS 47
Avaliação funcional da mutação Q660E ……..... 47
Avaliação funcional da mutação -95G>T..... 51
5. DISCUSSÃO 60
6. CONCLUSÕES 70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 71
8. APÊNDICE 92

Lista de abreviaturas

AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
DEHAL I	Desalogenase 1
DIT	Didiotirosina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Trifosfato desoxinucleotídeo
DT	Disgenesias tireoideanas
DUOX2	Dual oxidase 2
et al.	E outros/colaboradores
FOXE-1	Fator de transcrição tireoideano 2
GAPDH	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
hAIT	Transportador apical humano
HTs	Hormônios tireoideanos
I	Iodo
I^-	Íons iodeto
MIT	Monoiodotirosina
NIS	Simportador sódio-iodo
NKX2.1	Fator de transcrição tireoideano 1
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDS	Pendrina
RER	Retículo endoplasmático rugoso

RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RTSH	Receptor do *TSH*
T_3	Triiodotironina
T_4	Tetraiodotironina
TG	Tireoglobulina
TPO	Tireoperoxidase
TSH	Hormônio estimulante da tireóide

Lista de Figuras

Figura 1 Anatomia da tireóide..... 3

Figura 2 Representação esquemática da síntese dos hormônios tireoideanos 4

Figura 3 Modelo proposto da TPO humana..... 9

Figura 4 Algoritmo em prol da elucidação das bases moleculares dos defeitos de organificação do iodo..... 16

Figura 5 Heredograma da família das pacientes portadoras de HC, presença de bócio e DPII..... 23

Figura 6 Representação das etapas da construção dos plasmídios spTPO-95G spTPO-95T, xpTPO-95G e xpTPO-95T..... 33

Figura 7 Reações no teste de oxidação de iodeto..... 43

Figura 8 Cálculo da atividade específica da TPO..... 45

Figura 9 Cromatograma do sequenciamento de: a) pTPO contendo o cDNA da TPO selvagem; b) pTPO660 com a alteração 2068G>C..... 47

Figura 10 Gel de agarose 1,5% com amplificação do cDNA das células transfectadas..... 48

Figura 11 Valores médios (± erro padrão) da oxidação de iodeto (Abs/min) nas células transfectadas com plasmídios TPO e TPO-Q660E..... 50

Figura 12 Heredograma representando familiares das pacientes II.7 e II.10, portadoras da alteração -95G>T em homozigose..... 52

Figura 13 Expressão gênica no tecido das pacientes com HC, DPII e bócio..... 54

Figura 14 Atividade enzimática da TPO em tecido tireoidiana..... 55

Figura 15 Cromatograma do sequenciamento dos plasmídios xpTPO-95G e spTPO-95G e plasmídio xpTPO-95T e spTPO-95T..... 56

Figura 16 Expressão da luciferase sob ação da região promotora da TPO..... 57

Figura 17 Expressão do gene da luciferase com ação dos promotores xpTPO-95T e xpTPO-95G, na presença ou não de fatores de transcrição..... 58

Figura 18 Análise *in silico* para da região promotora de TPO..... 59

Lista de Tabelas

Tabela 1 Mutações no gene *TPO* humano identificadas em pacientes com HC..... 18

Tabela 2 Iniciadores específicos para o gene da *TPO*..... 26

Tabela 3 Iniciadores específicos para cDNA da TPO..... 27

Tabela 4 Iniciadores específicos para a amplificação do promotor do gene da *TPO*..... 28

Tabela 5 Iniciadores para amplificação do *enhancer* da *TPO*..... 28

Tabela 6 Iniciadores específicos para a amplificação do gene da DUOX..... 29

Tabela 7 Iniciadores empregados na PCR em tempo real..... 32

Tabela 8 Características dos plasmídios construídos neste estudo..... 36

Tabela 9 Valores obtidos no teste de oxidação de iodeto, a partir de lisado celular..... 49

Tabela 10 Dados laboratoriais das pacientes portadoras de HC e bócio..... 51

Tabela 11 Polimorfismos identificados no gene da *TPO* e DUOX2 em pacientes..... 53

Tabela 12 Expressão dos genes específicos da tireóide das pacientes II.7 e II.10..... 53

Tabela 13 Valores da atividade da TPO em amostras de tecido das pacientes portadoras..... 54

RESUMO

Introdução: O hipotireoidismo congênito é a causa mais comum de retardo mental evitável em crianças, sua incidência varia de 1:2000 a 1:3000 nascidos vivos. É estimado que 15-20% dos casos de HC são conseqüentes de falhas na síntese dos hormônios tireoidianos. Entre as alterações genéticas mais freqüentes destaca-se o defeito na atividade da tireoperoxidase. Objetivos: rastrear mutações em duas pacientes com HC, com defeito parcial de incorporação de iodeto e verificar o efeito funcional de alterações do gene da tireperoxidase. Casuística e métodos: duas pacientes com HC, bócio e diagnóstico molecular não conhecido. Amostras de sangue periférico e de tecido tireoidiano das pacientes e amostras de DNA de indivíduos controles. Sequenciamento dos genes *TPO*, *DUOX2* e *DUOXA2.* Análise da expressão gênica de *TPO*, *TG*, *NKX2.1*, *PDS*, *PAX8*, *NIS* e *rTSH* por PCR bem tempo real. Avaliação da expressão de luciferase sob controle do promotor da TPO e avaliação da atividaede da TPO do tecido as pacientes. Resultados: Nas pacientes foi identificada a alteração -95G>T, em homozigose, na região promotora da TPO. Verificamos diminuição da atividade enzimática da TPO no tecido tireoideano das pacientes e diminuição da expressão do RNAm desse gene. Também se encontrou diminuída a expressão dos genes *NKX2.1* e *PAX8*. Já os genes *TG*, *rTSH*, *PDS*, *NIS*, a expressão do RNAm apresentou-se aumentada. A análise funcional da alteração -95G>C não mostrou diminuição da expressão do gene repórter. Conclusão: O HC das pacientes deve-se a diminuição da atividade enzimática da TPO, contudo alterações de sequência não foram encontradas no gene da TPO que expliquem a diminuição da atividade. Alterações epigenéticas ou nos introns no gene da TPO poderiam explicar o HC das pacientes.
Descritores: Hipotireoidismo congênito, iodeto peroxidase, mutação, tireóide.

SUMMARY

Introduction: Congenital hypothyroidism is the most common cause of preventable mental retardation in children, its incidence varies from 1:2000 to 1:3000 live births. It is estimated that 15-20% of cases of CH are consistent failures in the synthesis of thyroid hormones. Among the most frequent genetic changes highlight the defect in the activity of thyroid peroxidase. Objectives: Identify mutations in two patients with CH and partial defect in iodide incorporation and verify the functional effect of changes in gene tireperoxidase. Methods: Two patients with CH, goiter and molecular diagnosis unknown. Samples of peripheral blood and thyroid tissue of patients and DNA samples from control subjects. Sequencing of the *TPO* gene, *DUOX2* and *DUOXA2*. Analysis of gene expression of *TPO*, *TG*, *NKX2.1*, *PDS*, *PAX8*, *NIS* and *TSHr* by real time. Evaluation of the expression of luciferase under control of the promoter of TPO and TPO activity evaluation of the patients tissue. Results: The patients were identified change-95G> T homozygous, in the promoter region of TPO. We observed decrease in enzymatic activity of TPO in thyroid tissues of patients and decreased RNAm expression of this gene. Also found decreased expression of genes NKX2.1 and PAX8. Since the genes TG, TSHr, PDS, NIS mRNA expression presented increased. Functional analysis of the change -95G>T showed no descrease in reporter gene expression. Conclusion: The CH of patients due to decreased enzymatic activity of TPO, but changes were not found in the sequence of TPO gene to explain the decrease in activity. Epigenetic alterations in introns or in the TPO gene could explain the HC patients.

Descriptors: Congenital hypothyroidism, iodide peroxidase, mutation, thyroid.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Tireóide

A tireóide foi descrita inicialmente por Galeno no século II d.C., mas recebeu esta denominação somente em 1656 por Thomas Wharton. A palavra tireóide é derivada do grego e significa "semelhante a um escudo". Sua função não era conhecida até o final do século XIX, quando 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 para disfunções dessa glândula (Moore KL, 2004).

É o primeiro órgão endócrino a se desenvolver. Em sua forma madura compõem-se de dois grupos celulares com origens embrionárias diferentes, a saber: células foliculares tireoideanas (CFT) e células parafoliculares (células C). Durante a quarta semana de gestação, forma-se o primórdio tireoideano a partir de um espessamento do epitélio endodérmico (divertículo endodérmico ventral) localizado no assoalho da linha média da faringe embrionária correspondente à base da língua. Inicialmente o primórdio fica conectado ao assoalho da faringe pelo ducto tireoglosso. Por volta da sétima semana migra caudalmente, perde sua conexão com a superfície e origina o parênquima tireoideano formado pelas células foliculares. As células foliculares organizam-se em folículos esféricos com células de tamanhos variados (50 a 500 um de diâmetro) cujo número pode exceder 20 milhões.

(Fagman & Nilsson, 2010). O mesênquima circunjacente se transforma no seu estroma formado por células C (Trueba *et al.*, 2005).

Este processo de crescimento e brotamento do primórdio tiroideano envolve, evidentemente, aumento muito rápido do número de células progenitoras, porém, recentemente, demonstrou-se que isso não ocorre por proliferação celular, mas, possivelmente, por recrutamento de células do endoderma vizinho (Fagman *et al.,* 2006).

Os mecanismos que causam a proliferação dos precursores e à formação dos lobos ainda não foram elucidados. A síntese dos hormônios tireoideanos inicia-se somente nos folículos em desenvolvimento, confirmando a interação direta da maturação estrutural e funcional da tireóide durante a diferenciação (Szinnai *et al.*, 2007*)*.

1.1.1. Anatomia e função

A tireóide é uma glândula endócrina localizada no pescoço anterior na frente da traquéia e imediatamente inferior à laringe entre as vértebras C5 até T1. Pesa cerca de 15-30 g e é recoberta pelos músculos do pescoço e suas respectivas fascias (Moore KL, 2004) (figura 1).

É constituída por dois lobos unidos por um istmo e revestidos por uma cápsula conjuntiva. É um órgão muito vascularizado rico em capilares sanguíneos e linfáticos. Seu suprimento sanguíneo advém das artérias tireóideas superiores (ramos das artérias carótidas externas) e artérias tireóideias inferiores (ramo das artérias subclávias). (Fagman *et al.*, 2006)

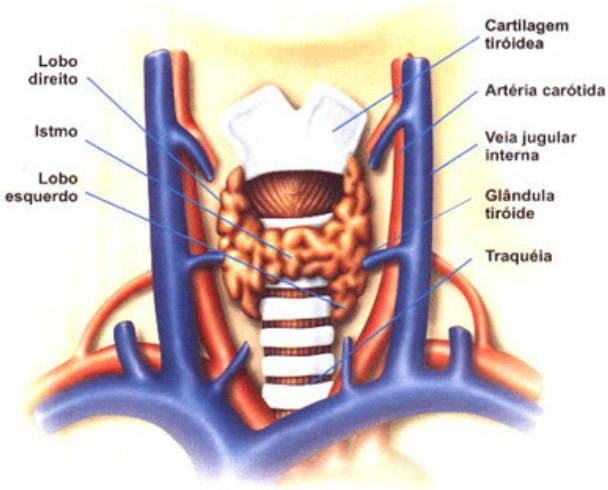


Figura 1: Anatomia da tireóide (*www.climedcap.com.br/imagens/tirei.gif)*

Sua principal função é a produção dos hormônios triiodotironina (T_3) e tetraiodotironina (T_4). No órgão adulto, as células foliculares são mais numerosas e responsabilizam-se pela produção dos hormônios tireoideanos (HTs). As células parafoliculares, por sua vez, são responsáveis pela produção de calcitonina (Mauchamp *et al.*, 1998).

Os HTs têm como função regular o consumo energético e são indispensáveis para crescimento, desenvolvimento e maturação de vários órgãos. Entre outras funções desses hormônios incluem-se o estímulo da frequência e da força da contração cardíaca, da síntese protéica e do metabolismo glicídio, o aumento de síntese e degradação do colesterol e triglicérides, e a potencialização da sensibilidade dos receptores β–adrenérgicos às catecolaminas (Whitley *et al.,* 1996).

Neste processo, é o iodo proveniente da dieta alimentar o elemento essencial. Após ser absorvido no trato gastrointestinal é captado e

acumulado na tireóide através de um sistema eficiente de transporte descrito por primeira vez por Baumann em 1896 (Dohan *et al.*, 2003).

A tireóide tem capacidade de concentrar iodo de 20 a 40 vezes mais que a concentração plasmática deste halogênio. Em condições fisiológicas e, devido ao seu arranjo folicular, a tireóide é capaz não só de transportar o iodo assim como também armazená-lo para uso futuro (Dohán *et al.*, 2000; Riedel *et al.*, 2001).

1.2. Biossíntese dos hormônios tireoideanos

A síntese dos hormônios tireoideanos ocorre através de uma seqüência de etapas que requerem a integridade de um complexo sistema protéico (Van Herle *et al.*, 1979; Dunn *et al.*, 2000; Taurog A, 2000; Kopp P, 2005) (Figura 2).

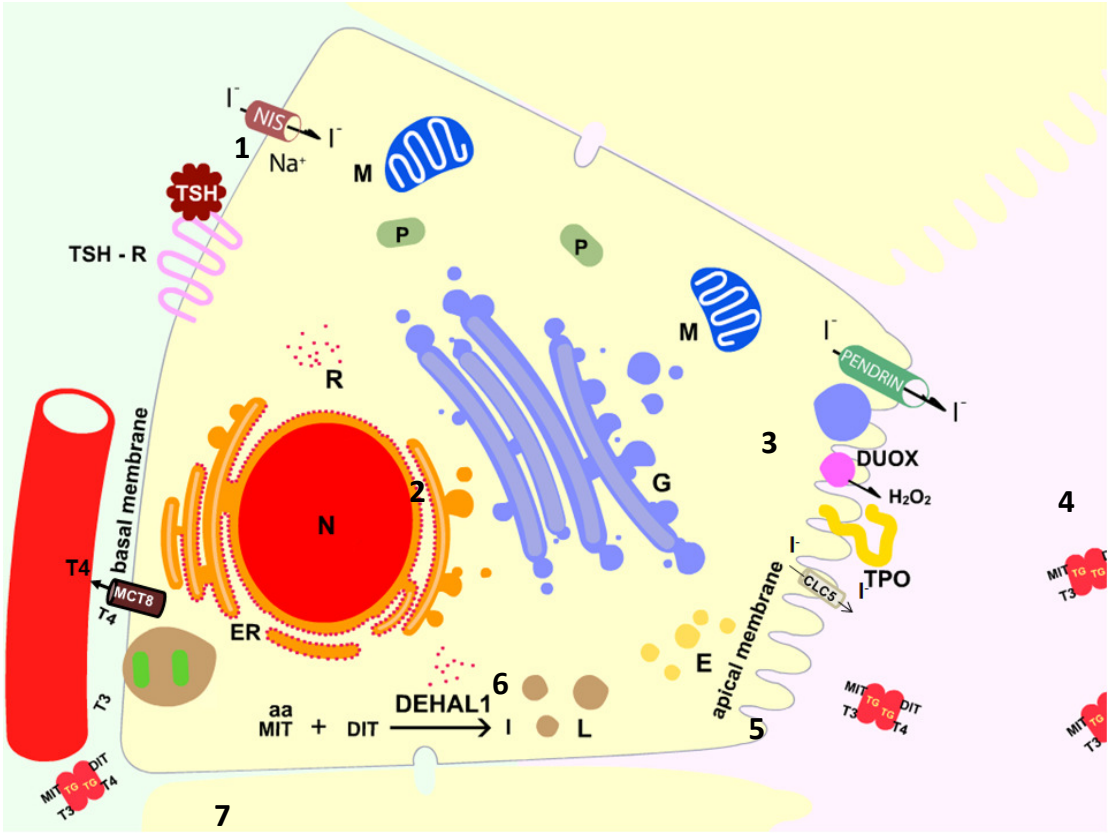


Figura 2: Representação esquemática da síntese dos hormônios tireoideanos. 1) o hormônio estimulante da tireóide (TSH) liga-se em seu receptor de membrana e estimula a síntese de RNA mensageiro (RNAm) da TG no núcleo da célula; 2) o RNAm sintetizado migra para o retículo endoplasmático rugoso (RER), onde ocorre a síntese protéica. Após a tradução, a proteína sofre intenso controle de qualidade realizado pelas chaperonas; 3) a TG migra do RER para o complexo de Golgi, já como um dímero, onde se completa o processamento pós-traducional (glicosilação); 4) a TG dimérica ainda imatura migra para o lúmen folicular por invaginação. A enzima TPO na presença de H_2O_2, sintetizado pelo sistema DUOX, promove a oxidação e o acoplamento do iodo no resíduo tirosil da TG para a formação de MIT e DIT. Ainda no lúmen folicular, ocorre a síntese dos hormônios tireoideanos (T_3 e T_4) pela junção de MIT e DIT; 5) o complexo TG-hormônio entra novamente na célula e sofre proteólise para a liberação dos hormônios tireoideanos na corrente sanguínea; 6) nesta etapa, a enzima DEHAL 1 retira o iodo não utilizado na síntese dos hormônios para ser reaproveitado pela célula; 7) moléculas de TG madura são liberadas na corrente sanguínea juntamente com os hormônios tireoideanos (ação do MCT8).

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

O hormônio tireo-estimulante (TSH), sintetizado na hipófise anterior, estimula a síntese hormonal pela ligação ao seu receptor (TSHR) localizado na membrana basolateral do tireócito. O iodo, na forma de iodeto, é então introduzido na célula tireoideana por transporte ativo pela membrana basolateral da célula folicular, por intermédio do simportador de sódio e iodeto ($Na+/I^-$ ou NIS) (De La Vieja *et al.*, 2000). Este processo, conhecido como captação de iodo, permite o transporte de dois íons de sódio, a favor de um gradiente eletroquímico para cada ânion de iodo contra o gradiente eletroquímico (Eskandari *et al.*, 1997).

O transportador aniônico pendrina (PDS) assim como o transportador apical humano (hAIT) permitem o transporte de iodeto para o colóide através da membrana apical (Everett *et al.*, 1999; Koop P, 2000; Rodriguez *et al.,* 2002). Recentemente foi descrita a proteína CLC-5, que forma um canal iônico localizado na membrana apical do tireócito que também transportaria iodo para o colóide (van den Hove *et al.*, 2006) (Figura 2).

Durante a hormonogênese, o iodeto deve ser oxidado para um estado mais elevado antes que consiga atuar como um agente ionizante. No lúmen da membrana, a tireoperoxidade (TPO) na presença do catalisador peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxida o iodeto e, subseqüentemente, permite a ligação do iodo aos resíduos tirosil da tireoglobulina (TG) intrafolicular, processo chamado de incorporação de iodeto. O H_2O_2 é gerado pelo complexo sistema formado por membros da família NADPH oxidase: dual oxidase 1 (DUOX-1), dual oxidase 2 (DUOX-2), e *dual oxidase maturation factor* 1: DUOXA2 (De Deken *et al.*, 2000, Grasberger & Refetoff, 2006).

As iodotirosinas da TG, também por ação da TPO, são conjugadas para formar monoiodotirosina (MIT) e didiotirosina (DIT). Uma molécula de DIT e uma de MIT se ligam para formar T_3 e duas de DIT se ligam para formar T_4. O complexo TG-hormônio formado entra na célula por invaginação e dentro dos lisossomos ocorre a proteólise para liberação dos HTs (T_3 e T_4) na corrente sanguínea, juntamente com algumas moléculas de TG madura. Recentemente, foi mostrado em sistema murino que o transportador MCT8, localizado na membrana basolateral, promove o transporte de T4 e T3 para a circulação (Di Cosmo *et al.*, 2010). As moléculas de MITs e DITs que não se ligaram para formar hormônio tireoideano sofrem a ação da enzima desalogenase 1 (DEHAL I), que libera o iodo para ser reaproveitado pela célula (Gnidehou *et al.*, 2004). Apenas pequena proporção da TG não hidrolisada entra na circulação sangüínea (Trotta EA, 1991) (Figura 2).

A proporção de T_3 e T_4 sintetizado depende da quantidade de iodo disponível e, portanto, da extensão da iodação da TG. O excesso de iodo geralmente exerce um efeito inibitório da síntese hormonal chamado efeito Wolff-Chaikoff que leva a um bloqueio do mecanismo de ionização, através da diminuição de produção de H_2O_2 (Wolff & Chaikoff, 1944)

Em condições normais, a tireóide forma mais T_4 do que T_3. A totalidade do T_4 circulante provém da tireóide, enquanto apenas 10-30% do T_3 é de origem glandular. A maior parte do T_3 circulante resulta da transformação do T_4 e em T_3, por ação das enzimas desiodases tipos I e II (Trotta EA, 1991; Cavalieri RR, 1997).

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 dos hormônios para os tecidos, sendo que apenas 0,03% a 0,05% do T_4 e 0,5% do T_3 são encontrados em forma livre no sangue (Fisher DA, 1998).

1.3. A tireoperoxidase

A peroxidase da tireóide ou tireoperoxidase (TPO) é uma hemoglicoproteína tipo I de transmembrana, de passagem única, que se localiza na membrana apical dos tireócitos com o sítio catalítico exposto para o lúmen folicular (Medeiro-Neto *et al.*, 1993; Taurog A, 2000; Vaismann *et al.*, 2004).

A TPO é a enzima chave na síntese do hormônio tireóideo, sendo responsável por três reações importantes: a oxidação de íons iodeto (I^-), iodação das tirosinas da TG e o acoplamento das tirosinas iodinizadas (acoplamento) para a formação dos hormônios T_4 e T_3 (Taurog A, 2000; Larsen *et al.*, 2003).

Se a TPO está envolvida apenas na iodação dos resíduos de tirosina ou no acoplamento de resíduos de tirosina iodado ao hormônio tireoidiano ainda é questionável. Por isso, é provável que o estado de iodo seja determinante para o fenótipo de defeito de organificação de iodo (Ris-Stalpers & Bikker, 2010).

A TPO (OMIM 606765), sintetizada nos polissomos, atravessa a membrana do retículo endoplasmático rugoso da célula folicular, para ser

parcialmente glicosilada no lúmen folicular. Posteriormente é transportada junto com a TG até o aparelho golgiense, onde se completa a glicosilação, e é transferida para a membrana apical através de vesículas exocíticas do aparelho golgiense (DeGroot & Niepomniszcze *et al.,* 1977; Ris-Stalpers & Bikker, 2010).

O gene que codifica para a TPO humana está localizado no cromossomo 2p25 e a seqüência completa está formada por 150 Kpb e dividida em 17 exons e 16 introns (Endo *et al.*, 1995). O mRNA contem 3048 pares de bases e codifica uma proteína de 933 aminoácidos com peso molecular aproximado de 105 kDA de DNA. Esta proteína inclui um peptídeo sinal de 14 aminoácidos que atua na sua translocação através da membrana do reticulo endoplasmático. (http://www.uniprot.org/uniprot/P07202). O sítio ativo da proteína é codificado pelos exons 8, 9 e 10 do gene (Kimura *et al.*, 1987, Kimura *et al.*, 1989).

A enzima apresenta sítios de ligação do grupo heme em conjunto com cinco sítios de glicosilação e diversas pontes dissulfeto (Figura 3) (Taurog A *et al.*, 1991; http://www.uniprot.org/uniprot/P07202). Acredita-se que a inserção do grupo heme e a interação molecular das proteínas chaperonas calnexina e calreticulina sejam de crucial importância para a configuração espacial final da proteína e funcionem como marcadores para a saída da proteína final pelo retículo endoplasmático rugoso (Fayadat *et al.,* 1999; Fayadat *et al.,* 2000). Outra modificação pós-traducional da TPO é a clivagem do propeptídeo por uma endoprotease (Le Fourn *et al.*, 2005).

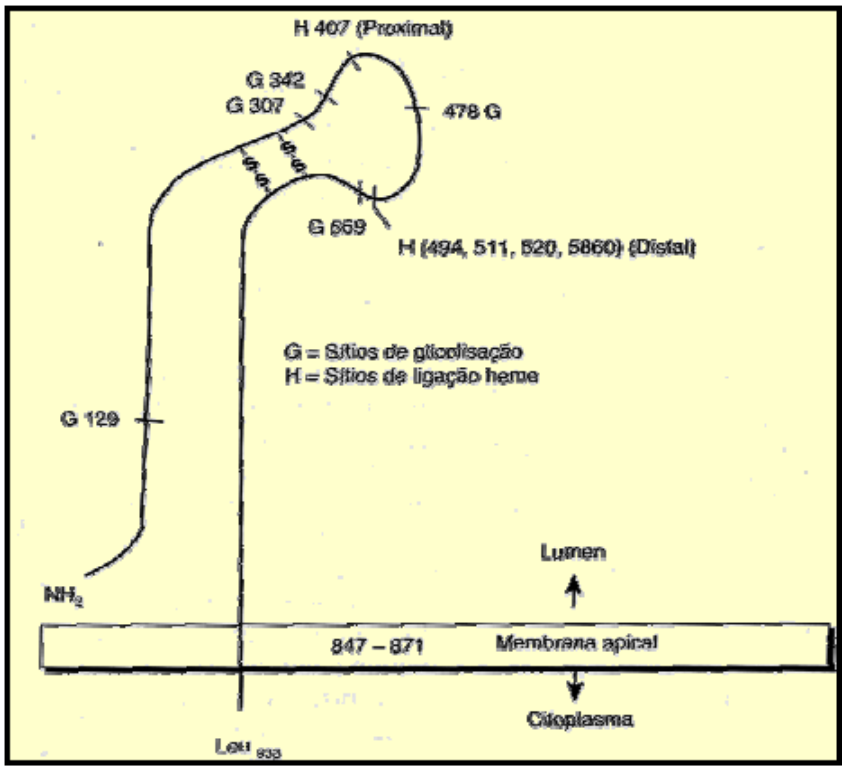


Figura 3: Modelo proposto da TPO humana mostrando os sítios de glicosilação (G) e os sítios de ligação do grupo heme, localizados nos resíduos histidina (his=H) (adaptado de Taurog A *et al.*, 1991).

Outras espécies de mRNA da TPO humana de tamanhos variáveis (4,0kb, 2,1kb e 1,7kb) foram identificadas em culturas de células tireóideas e em tecidos tireoideanos normais e de pacientes com doença de graves (Nagayama *et al.*, 1989, Zanelli *et al.*,1990, Ferrand *et al.*, 2003). De todas as variantes, sabe-se que apenas a TPO3 e a TPO4 representam as formas enzimaticamente ativas. Estas, entretanto, apresentam um tempo de vida médio mais curto do que o observado para a proteína normal, TPO1 (Ferrand *et al.*, 2003). A atividade biológica dessas TPOs menores, possivelmente produtos de clivagem da proteína ou de *splicing* alternativo do mRNA da TPO 1, ainda não foi determinada (Vaisman *et al.*, 2004).

O gene da *TPO* é expresso principalmente na tireóide, traquéia e glândulas salivares (Aza Blanc *et al.*, 1993). Sua expressão é controlada pelo TSH através de um sistema dependente de 3'5'-adenosina monofosfato cíclico (AMPc)/proteína quinase A (Gerard *et al.*, 1989) assim como também pela insulina e vários fatores de transcrição, NKX2.1, FOXE1 e PAX8 que se ligam em sítios específicos do promotor (Abramowicz *et al.*, 1992).

O promotor de *TPO* possui a sequência TATAbox na posição -25 do ponto de início da transcrição (Kimura *et al.,* 1989). São encontrados também diversos sítios de ligação dos fatores de transcrição NKX2.1, FOXE1 e PAX8. Genes sujeitos ao rápido controle transcricional do AMPc geralmente apresentam um CRE (elemento responsivo ao AMPc) na região proximal do promotor. Interessantemente, ao longo da sequencia do promotor da *TPO* não há uma região CRE, mas há um motivo CRE-*like*. Estudos mostraram que a deleção deste motivo não interfere na estimulação de gene por AMPc, mostrando que esta região não é necessária para transcrição estimulada por AMPc na expressão tecido-específico. (Abramowicz *et al.*, 1992).

Em 2007, Cuesta *et al.*, mostraram que a interação entre o *FOXE1* e o promotor da *TPO* precede a ativação da transcrição, e que simultaneamente ficam accessíveis novas regiões da cromatina do promotor. Observaram ainda que a ligação entre o FOXE1 e o promotor da *TPO* é suficiente para modificar a estrutura compactada da cromatina, expondo um novo domínio local. Sendo assim, a expressão de TPO também parece ser

regulada pelo remodelamento da cromatina provocado, pelo menos, pela ligação de FOXE1.

1.4. Hipotireoidismo Congênito

O hipotireoidismo congênito (HC) é a causa mais comum de retardo mental evitável em crianças (Gruters A, 1992) e pode ser detectado através do “teste do pezinho”, exame realizado pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal (Foley TP, 2000; Medeiros-Neto G, 2003).

Com exceção de raros casos de hipotireoidismo central devido a defeitos no hipotálamo ou na hipófise, o HC é caracterizado por níveis elevados de TSH em resposta à redução dos hormônios tireoidianos (LaFranchi S, 1999; Park & Chatterjee, 2005).

Uma vez diagnosticado, deve ser tratado até o primeiro mês de vida a fim de evitar a ocorrência de prejuízos no desenvolvimento do sistema neuro-psiquico-motor (Gruters A, 1992). A severidade desses efeitos pode ser correlacionada com a época de detecção da doença, o início da terapia de reposição hormonal, a magnitude da deficiência, bem como a concentração de iodo nutricional (Portefield & Hendrich, 1993; Lindsay & Toft, 1997).

Estudos mostram que a incidência do HC pode variar dependendo de etnias, presença de consangüinidade ou área geográfica. Observa-se maior prevalência de HC em hispânicos e caucasianos que em negros, sendo de três a quatro vezes mais freqüente no gênero feminino comparativamente ao

masculino. Na maioria das vezes a causa não é hereditária (Hinton *et al.*, 2010).

A incidência do HC primário em países com aporte suficiente de iodo varia de 1:2000 a 1:3000 nascidos vivos. Nos últimos anos a incidência do HC vem aumentando devido à diminuição dos valores de corte do TSH empregado na detecção da doença (Deladöey *et al.*, 2008, Loeber JG, 2007; Corbetta *et al.*, 2009). Nos Estados Unidos o aumento da população hispânica em alguns estados, provocou o aumento da incidência do HC (Hinton *et al.*, 2010).

Em países com aporte suficiente de iodo, as disgenesias tireoideanas (DT) ou falhas na organogênese da glândula são responsáveis por 80-85% dos casos de HC permanente. As DTs podem ser divididas em 3 categorias: ectopia (tecido tireóideo localizado em posição anormal, desde a base da língua até o mediastino, 60% dos casos), atireose (não detecção da glândula tireóide, 15% dos casos) e hipoplasia (glândula de tamanho reduzido que se situa em posição cervical normal, 10% dos casos) (Klett M 1997, Knobel & Medeiros, 2003).

Até o presente momento, a fisiopatologia da DT permanece obscura e geralmente é considerada esporádica, contudo de 2 a 5% dos casos são familiares. Estudos recentes revelaram uma maior proporção de DT familiar e sugerem a existência de componente familiar envolvendo fatores de predisposição genética dominante com baixa penetrância. Por outro lado, há relatos de casos onde se verificou discordância de DTs em gêmeos monozigóticos (Perry *et al.,* 2002; Olivieri *et al.*, 2007; Castanet *et al.*, 2010).

Em pequena proporção de pacientes, a disgenesia tireoideana foi associada a mutações em genes responsáveis pelo desenvolvimento ou proliferação das células foliculares como *NKX2*.1 (Krude *et al.*, 2000); *FOXE-1* (Clifton-Blingh *et al.*, 1998, Castanet *et al.*, 2002); *PAX8* (Congdon *et al.*, 2001); no gene do hormônio tireo-estimulante (*TSH*) (Borck *et al.*, 2004) e no receptor do *TSH* (*RTSH*) (Tonacchera *et al.,* 2000).

É estimado que os outros 20-15% dos casos de HC são conseqüentes de defeitos no mecanismo bioquímico responsável pela biossíntese dos hormônios tireoideanos ou disormonogênese e geralmente estão associados à presença de bócio (Delange *et al.*, 1997; Macchia *et al.*, 1999; Rubió & Medeiros-Neto, 2002).

1.4.1. Mutações gênicas associadas às disormonegenes

A maioria dos casos de HC por disormonogênese é causado por mutações em genes que codificam as proteínas responsáveis pela síntese de hormônios da tireóide, como a TG (Pardo *et al.*, 2008, Rubio *et al.*, 2009), TPO (Abramowicz *et al.*, 1992a, Abramowicz *et al.*, 1992b; Santos *et al.*, 1999, Rivolta *et al.,* 2003), NIS (Pohlenz *et al.*, 1997), pendrina (Everett *et al.*, 1997; Kopp P, 2000; Borck *et al.*, 2003), DUOX2 (Moreno *et al.*, 2002; Varela *et al.*, 2006), DUOXA2 (Grasberger & Refetoff, 2006) e DEHAL1 (Moreno *et al.*, 2008).

A maioria das mutações nos genes da biossíntese dos hormônios tireoideanos são autossômicas recessivas, e em alguns casos provocam fenótipos característicos. Mutações em *DEHAL1* (extrememente raras)

levam ao bócio, hipotireoidismo e retardo mental, um fenótipo clínico descrito ainda na década de 1950, cujo diagnóstico principal característico é a elevação da iodotirosinas no soro e urina (Moreno & Visser, 2010).

Indivíduos portadores de mutações no gene da TG podem ser identificados por apresentar HC com valores indetectáveis de TG sérica, que não se elevam após a administração do TSH humano recombinante (Pardo *et al.*, 2008). Já foram identificadas mais de 50 mutações, observando-se variações fenotípicas dos pacientes portadores destas mutações, quanto ao grau do HC ou tamanho do bócio (Pardo *et al.*, 2008, Rubio & Medeiros, 2009).

Até o momento, 12 mutações no gene *NIS* foram identificadas em pacientes com HC com baixa captação de radioiodo pela glândula e baixa relação da concentração de Iodo Saliva/Plasma (~1,6; normal: >20) (Spitzweg & Morris, 2010).

Mais de 150 mutações já foram identificadas no gene da pendrina, todas associadas à Síndrome de Pendred, cujas características são HC ou eutireodismo com perda de audição neurosensorial e malformação do ouvido interno (Bizhanova, & Kopp 2010).

As mutações nos genes *TPO* e do sistema gerador de peróxido de hidrogênio *DUOX* são considerados defeitos da organificação de iodeto. Em ambos casos, os pacientes apresentam HC, bócio de grau variável, TG sérica elevada e descarga de iodeto positiva no teste de perclorato. Os pacientes podem apresentar defeito total de incorporação de iodeto, quando a descarga de iodeto após a administração de perclorato de potássio é

>80%, ou defeito parcial de incorporação de iodeto quando a descarga é de 20-80% (Knobel & Medeiros-Neto, 2003).

Recentemente foi proposto um algoritmo para tentar abordar as bases moleculares dos defeitos de organificação do iodo (Figura 4).

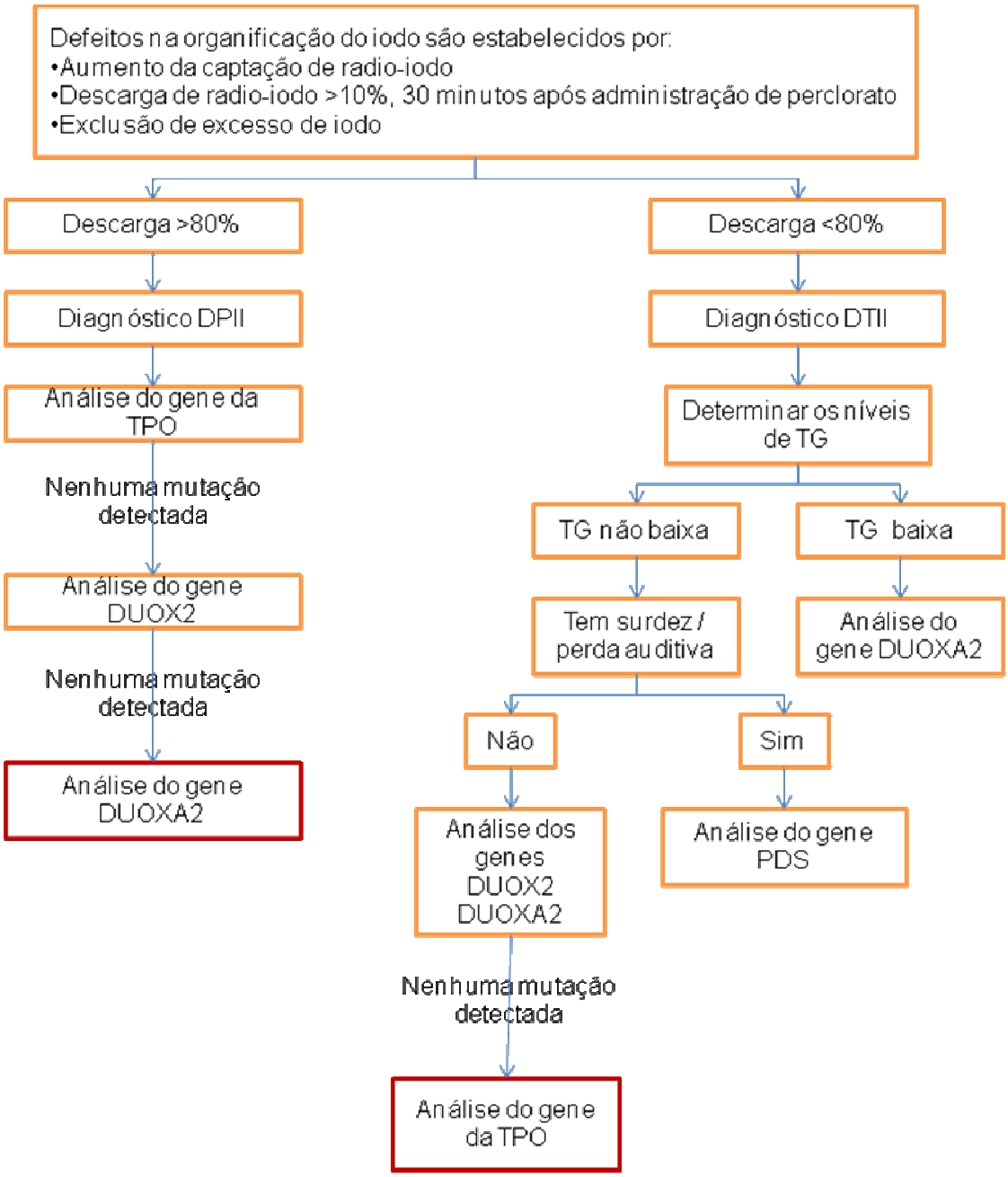


Figura 4: Algoritmo em prol da elucidação das bases moleculares dos defeitos de organificação do iodo. As decisões em laranja são realizadas com base nas evidências da literatura. Em vermelho, as opções hipotéticas para a base molecular dos defeitos de organificação do iodo. (Adaptado de Ris-Stalpers & Bikker, 2010)

1.4.2. Mutações no sistema gerador de peróxido de hidrogênio DUOX

A glândula tireoideana é o único órgão endócrino que requer H_2O_2 para a formação de hormônios. A enzima DUOX2 é a principal responsável pela síntese de H_2O_2 (Ohye & Sugawara, 2010). Também participa DUOX1,cujo gene compartilha 83% de similaridade com o gene *DUOX2*. No entanto, a proteína tireoidena DUOX1 parece desempenhar um papel menor na produção de H_2O_2 (Ohye & Sugawara, 2010).

As proteínas DUOX requerem os fatores de ativação DUOXA1 ou DUOXA2 que permitem a translocação de DUOX do retículo endoplasmático para a membrana plasmática apical, onde ocorre a produção de H_2O_2. As células da tireóide contêm antioxidantes para proteger as células dos danos oxidativos da mediação da H_2O_2 (Vaisman *et al.,* 2004)

Mutações nos genes *DUOX2* ou *DUOXA2* foram recentemente descobertas como a causa do HC devido à produção de H_2O_2 insuficiente (Ohye & Sugawara, 2010). Mais de 20 mutações foram identificadas em *DUOX2* até o momento. Mutações bialélicas foram associadas a HC permanente, e mutações monoalélicas foram associadas a HC transitório (Moreno *et al*., 2002). No entanto, recentemente foram descritas mutações bialélicas em *DUOX2* em pacientes com HC transitório ou HC subclínico (Maruo *et al*., 2008, Tonachera *et al*., 2009). Um único caso de mutação em *DUOXA2* foi descrito em paciente com HC permanente (Zamproni *et al*., 2008).

1.4.3. Mutações no gene da Tireoperoxidase

As alterações genéticas mais frequêntes nas disormogêneses (50% dos casos) são as mutações no gene da *TPO*, que provocam alteração ou ausência, da atividade enzimática tireoperoxidase (TPO). Estas mutações apresentam herança autossômica recessiva (Knobel & Medeiros, 2003). Até o momento foram descritas 64 mutações neste gene (Tabela 1).

Tabela 1: Mutações no gene *TPO* humano identificadas em pacientes com Hipotiredismo Congênito.

EXON/INTRON	cDNA	PROTEINA	TIPO DE ALTERAÇÃO	REFERÊNCIA
2	31_50dup	E17DfsX77	Frameshift	Bikker *et al.*, 1994
3	157G>C	A53P	Missense	Niu *et al.*, 2002
4	215delA	Q72AfsX15	Frameshift	Rivolta *et al.*, 2007
4	349G>C	D117H	Missense/sítio splicing	Bakker *et al.*, 2000
5	387delC	N129KfsX80	Frameshift	Rivolta *et al.*, 2003
5	391T>C	S131P	Missense	Rodrigues *et al.*, 2005
6	523C>T	R175X	Nonsense	Avbelj *et al.*, 2007
6	524G>A	R175Q	Missense	Umeki *et al.*, 2004
7	703C>T	Q235X	Nonsense	Pfarr *et al.*, 2006a
7	718G>A	D240N	Missense	Kotani *et al.*, 1999
8	839G>A	P280P	Neutra	Avbelj *et al.*, 2007
8	843delC	A282RfsX36	Frameshift	Wu *et al.*, 2002
8	875C>T	S292F	Missense	Tenenbaum-Rakover *et al.*, 2007
8	920A>C	N307T	Missense	Rivolta *et al.*, 2003
8	940C>T	R314W	Missense	Fuchs *et al.*, 2008
8	943C>T	Q315X	Nonsense	Alper *et al.*, 2010
8	976G>A	A326T	Missense	Bakker *et al.*, 2000
8		G319R	Missense	Ozbek *et al.*, 2009
8	1132G>A	E378K	Missense	Tajima *et al.*, 2005
8	1152G>T	E384D	Missense	Nascimento *et al.*,

				2003
8	1159G>A	G387R	Missense	Rivolta *et al.*, 2007
8	1183_1186dup	A396PfsX76	Frameshift	Abramowicz *et al.*, 1992
8	1274A>G	N425S	Missense	Rodrigues *et al.*, 2005
8	1297G>A	V433M	Missense	Rivolta *et al.*, 2003
8	1336delC	Q446RfsX5	Frameshift	Bakker *et al.*, 2000
8	1338G>C	Q446H	Missense / sítio splicing	Simm *et al.*, 2009
9	1339A>T	I447F	Missense / sítio splicing	Bikker *et al.*, 1997
9	1357T>G	Y453D	Missense	Bikker *et al.*, 1995
9	1373T>C	L458P	Missense	Ambrugger *et al.*, 2001
9	1430_1450del	A477_N483del	Deleção	Avbelj *et al.*, 2007
9	1472G>A	R491H	Missense	Ambrugger *et al.,* 2001
9	1477G>A	G493S	Missense	Wu *et al.*, 2002
9	1496C>T	P499L	Missense	Rivolta *et al,* 2003
9	1496delC	P499RfsX3	Frameshift	Deladöey *et al.*, 2008
9	1581G>T	W527C	Missense	Bakker *et al.*, 2000
9	1597G>T	G533C	Missense / sítio de splicing	Kotani *et al.*, 2003
10	1618C>T	R540X	Nonsense	Bikker *et al.*, 1995
10	1690C>A	L564I	Missense	Nascimento *et al.*, 2003
10	1718_1723del	A574_L575del	Deleção	Kotani *et al.,* 2003
10	1768G>A	G590S	Missense / sítio splicing	Bikker *et al.*, 1995
IVS10	1768+1G>A		Sítio de splicing	Bakker *et al.*, 2000
11	1943G>A	R648Q	Missense	Pannain *et al.*, 1999
11	1955dupT	F653VfsX16	Frameshift	Deladöey *et al.*, 2008
11	1978C>G	Q66OE	Missense	Santos *et al.*, 1999
11	1993C>T	R665W	Missense	Umeki *et al.*, 2002

11	1994G>A	R665Q	Missense	Nascimento *et al.*, 2003
11	1999G>A	G667S	Missense	Avbelj *et al.*, 2007
12	2077C>T	R693W	Missense	Bakker *et al.*, 2000
12	2153_2154del	F718X	Nonsense	Bakker *et al.*, 2000
13	2243delT	V748GfsX50	Frameshift	Niu *et al.*, 2002
13	2268dupT	E757X	Nonsense	Wu *et al.*, 2002
13	2311G>A	G771R	Missense	Umeki *et al.*, 2002
13	2386G>T	N796Y	Missense / sítio splicing	Wu *et al.*, 2002
14	2395G>A	E799K	Missense	Bikker *et al.*, 1995
14	2413delC	H805WfsX27	Frameshift	Wu *et al.*, 2002
14	2421dupC	C808LfsX72	Frameshift	Bikker *et al.*, 1995
14	2422del	C808AfsX24	Frameshift	Bakker *et al.*, 2000
14	2422T>C	C808R	Missense	Rivolta *et al.*, 2003
14	2475C>T	C825C	Neutra	Avbelj *et al.*, 2007
14	2512T>A	C838S	Missense	Rodrigues *et al.*, 2005
14	2512delT	C838AfsX1	Frameshift	Ambrugger *et al.*, 2001
15	2578G>A	G860R	Missense	Avbelj *et al.*, 2007
15	2619G>A	W873X	Nonsense	Simm *et al.*, 2009
IVS15-exon16	2619-6_2622del	?	Deleção	Tajima *et al.*, 2005
16	2722_2731del	A908LfsX969	Frameshift	Pfarr *et al.*, 2006b
16	2748G>A	Q916Q	Neutra / sítio splicing	Rodrigues *et al.*, 2005

*Nomenclatura de acordo com *Human Genome Variation Society. A* primeira A do codon de iniciação é considerada a posição +1. A numeração está de acordo com o mRNA da TPO (GeneBank Accession number: NM_000547).

Diferentes estudos mostraram, através de experimentos *in vitro,* que mutações no gene *TPO* identificadas em pacientes com HC com defeito de captação de iodeto alteram: 1) a localização da TPO, a qual fica incapaz de migrar até a membrana plasmática (Umeki *et al.*, 2004), 2) a atividade

enzimática mantendo sua localização normal (Bikker *et al.*, 1997), perdendo em todos os casos sua capacidade catalizadora.

A atividade enzimática da TPO depende da 1) correta estrutura protéica e localização correta (membrana); 2) sítio catalítico intacto (região ligante heme codificada pelos exons 8, 9 e 10 (Ruf & Carayon, 2006).

Três diferentes mecanismos podem alterar a atividade da TPO. Primeiro, a alteração na sequência dos aminoácidos, causada por uma mutação, pode tornar a proteína truncada tendo expressão deficitária na membrana, devido a falta de domínios intracelulares e de trans-membrana. Segundo, a substituição de um aminoácido pode induzir alterações na estrutura terciária da proteína ou interromper a sequência de glicosilação. Assim, a mutação na TPO pode provocar erro na estrutura da proteína, fazendo com que esta fique presa ao retículo endoplasmático, perdendo sua função pela localização incorreta (Kuliawat *et al.*, 2005). Terceiro, a substituição de um aminoácido pode prejudicar a atividade da proteína sem alterar sua estrutura e localização (Bikker *et al.*, 1997).

2. OBJETIVOS

2.1. Avaliar in vitro o impacto da mutação Q660E, identificada em pacientes brasileiros, na atividade da proteína tireoperoxidade (TPO);

2.2. Caracterizar o perfil molecular de pacientes portadoras de hipotireoidismo congênito, com defeito parcial de incorporação de iodeto e bócio, e avaliar o efeito funcional das alterações gênicas identificadas nas pacientes na atividade da TPO.

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP – nº 0924/07). Pacientes e participantes foram incluídos somente após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

3.1. Pacientes

Este estudo contou com a participação de duas pacientes com HC, irmãs oriundas de casamento consangüíneo, portadoras de bócio e sem diagnóstico molecular definido, familiares (figura 5) e 126 indivíduos sem doença tireoideana. Amostras de tecido sanguíneo foram obtidas das pacientes, familiares e indivíduos controle para obtenção de DNA. Amostras de tecido tireoideano das pacientes foram coletadas durante procedimento cirúrgico para tireoidectomia. As amostras de tireóide foram armazenadas em nitrogênio líquido logo após a coleta.

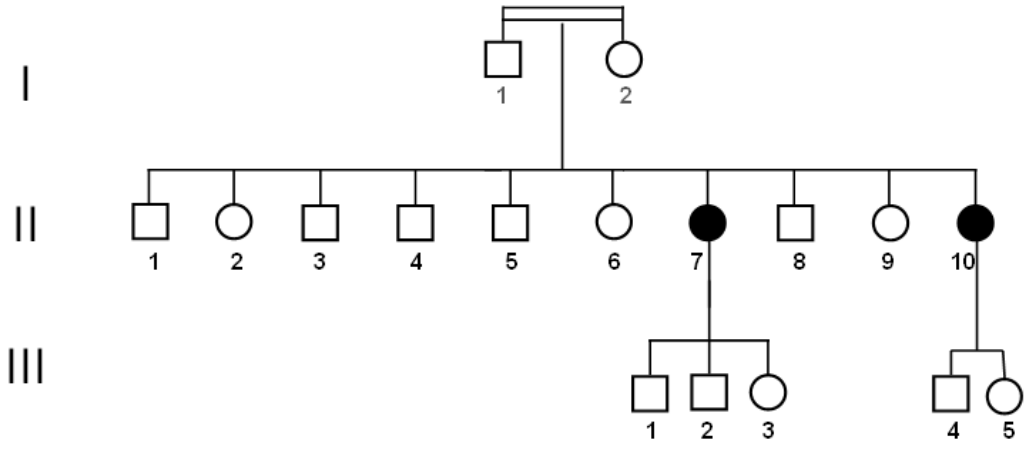


Figura 5: Heredograma da família das pacientes portadoras de HC, presença de bócio e DPII (II.7 e II.10).

3.2. Avaliação da função tireóidea

Para confirmação da função tireoideana dos sujeitos incluídos no estudo foram realizadas as dosagens de TSH; T4 total; T4 livre e TG séricas, empregando-se os estojos comerciais (Elecsys electroquimioluminescência, Roche *Diagnostics Corporation* Indianópolis, IN).

3.3. Teste de perclorato

Para confirmação do DPII, foi realizado o teste de descarga de perclorato três semanas após a retirada de L-T4 através da administração de 25µCi 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 libera apenas o iodeto concentrado pela célula folicular, mas ainda não incorporado à TG. Pacientes com defeito parcial de incorporação de iodeto (DPII) apresentam descarga do traçador de 25-79%, enquanto os pacientes com defeito total apresentam descargas maiores que 80%. Em indivíduos com função tireoideana normal, de 10 a 15% do radioiodo é liberado.

3.4. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico através do método de SDS-proteína K (Miller *et al.*, 1988).

3.5. 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/µL.

3.6. 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 descritos na tabela 2.

As reações foram feitas em 25µL, contendo de 100-300ng de DNA genômico, 2,5mM $MgCl_2$, 0,2mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), PCR buffer 0,1U de *Taq* polimerase (Invitrogen, *Life Technologies*, Carlsbad, CA) e 10µM de cada iniciador. As amostras foram denaturadas a 95ºC por 3 minutos. Posteriormente foram realizados 40 ciclos de amplificação: 95ºC por 30 segundos, 57ºC por 30 segundos e 72ºC por 1 minuto. Depois do último ciclo, as amostras foram incubadas a 72ºC 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 2: Iniciadores específicos para a amplificação de cada um dos exons e bordas exon/intro do gene da *TPO* (Bikker *et al.,* 1995).

EXON	TAMANHO AMPLIFICADO (BP)	INICIADORES
1	510	5´-GC.Clamp-TCTCCCTGTATAATTTTTCCCC-3´ 5´-CAGCTTTGCTGAGAGACGC-3´
2	277	5´-GC.Clamp-TCCCATGGCCCTTGTCAGT-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´-CATGTTCAGATCCAACTTTCAC-3´
6	298	5´-ACTGCTTCTGTGTTCTTCTCCC-3´ 5´-GC.Clamp-AAGGCTATTTCCCTCCCTCA-3´
7	410	5´-GC.Clamp-GGTCATCTTTCTGCTACCAC-3´ 5´-CTGCTACCCCTGGGAATAGG-3´
8ª	303	5´-GC.Clamp-TGACCTTGAACTCCCCTTTG-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
14A	366	5´-GC.Clamp-CCTCCCCAGAGAGAAGCAC-3´ 5´-AGATGGTGATTGACAGTTGCC-3´
14B	203	5´-GC.Clamp-CCTCCCCAGAGAGAAGCAC-3´ 5´-GGTGTTTCTGCACCTCGC-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-AATGTTTGTTCTGGATTTTTGC-3´ 5´-GACAGGAGGATTGCAAGAGTG-3´

Quando necessário, foi utilizado iniciadores para amplificação da sequência do cDNA da TPO que anelam-se em regiões exônicas (tabela 3).

Tabela 3: Iniciadores utilizados para confirmar a presença do cDNA da TPO selvagem e mutado nos plasmídios

EXON	INICIADORES
3TP3	5' GCCTACCTGCCCTTCGTG 3'
5TP3	5' CAGATGACTTGTGAGAACCAA 3'

Para a amplificação do promotor do gene da *TPO* foram empregados os iniciadores descritos na tabela 4. As reações foram feitas em 25µL, contendo de 100-300ng de DNA genômico, 2,5mM $MgCl_2$, 0,2mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), PCR buffer 0,1U de *Taq* polimerase (Invitrogen, *Life Technologies*, Carlsbad, CA) e 10µM de cada iniciador.

As amostras foram denaturadas a 95ºC por 3 minutos e posteriormente, foram realizados 40 ciclos de amplificação: 95ºC por 30 segundos, 60ºC por 30 segundos e 72ºC por 1 minuto. Depois do último ciclo, as amostras foram incubadas a 72ºC 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 4: Iniciadores específicos para a amplificação do promotor do gene da *TPO.*

PROMOTOR	TAMANHO AMPLIFICADO (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' CCATGAGCCTCCAGAAACTG 3'

Foi estudado também uma sequencia de 650pb correspondente a um *enhancer* do promotor do gene da *TPO*, localizado a 5,5kb *upstream* do início da tradução. Foram utilizados os iniciadores descritos na tabela 5 e mesma reação de amplificação utilizada na amplificação do promotor da *TPO*.

Tabela 5: Iniciadores para amplificação do *enhancer* da *TPO* (Kikkawa et al, 1990).

ENHANCER* DE *TPO	TAMANHO AMPLIFICADO (PB)	INICIADORES
1	501	5' GCCACAAGGGATAATGGAAA 3' 5' TCAGCTATCCGCTAACTCA 3'
2	344	5' TAGGTGATGCAGGCATTTCA 3' 5' TTCAGATCTGGGATTCCATCTT 3'

3.7. Amplificação do gene DUOX2

Para amplificação dos 33 exons e bordas exon/intron do gene *DUOX2* foram empregados os iniciadores descritos por Moreno *et al.* (2002) (Tabela 6).

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 $MgCl_2$, 200 µM de cada dNTP, 12,5 pmol de cada iniciador e 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, *Life Technologies*, Carlsbad, CA). As reações foram incubadas a 95ºC por 8 minutos, e 40 ciclos de 1 minuto a 95ºC; 1 minuto a 60ºC e 2 minutos a 72ºC e finalmente 10 minutos a 72ºC.

Tabela 6: Iniciadores específicos para a amplificação dos exons e bordas exon/intron do gene da DUOX (Moreno *et al.,* 2002).

EXON	TAMANHO AMPLIFICADO (PB)	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' TACGGACGGTTTGTCACG 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'GAGGGATGGGGCAACAGT3' 5' AGGCTGAGGAGCAGTCTGAG 3'
13	220	5' CTTCCCATCCCAGTGACTTC 3' 5' GCACCCTCAATCTTGATCCt 3'
14 3 15	301	5' AAGAGGTCTGGCCACATAGC 3' 5' TTCTCCCAGACTCCTGTCTCTC 3'
17	326	5' CAACCCAAGATCCATTGAGG 3' 5' TTCTATGCAGCCCAGGTTTC 3'
18 e 19	204	5' GCTTCCAGCATAGGCTTCAC 3' 5'CTGGACCTGTTTTCCTGTTTG3'
20	325	5' ACCTACCCAAGCCTGACCTT3' 5' CCCACCAGGAACTCTCATTT 3'
22	213	5' GTTCTCCTGGCTGCAAAGAC 3' 5' GATATGTGGGTGGGGCCTA 3'
23	305	5' ATGGAGTGGCATTAAGGGAAG 3' 5' TCTTAGGATCAGAGGGCTTTCC 3'
24	305	5' CCTGTGCCAAGCTGATGTAA 3' 5' GCTGCAGCAAAGAGGAAGAA 3'
25	184	5' AGTCTGTCCTGGTTGGCATC 3' 5' CACCCTATGAGTCCCAGGAG 3'
26	208	5' GCTGGAGCCCCTCCT 3' 5' GACCCCATGGCCAGTATAGA 3'
27 e 28	287	5' CCCAAGCTGAAGTCCTGAGA 3' 5' TGAAGATTTGGCCTCTGTCG 3'
29	345	5' GAGCAGGCCTTCTCATCTGT 3' 5' ATAGGGAAGGGCAGAGATCC 3'
30	251	5' CAGGGTCAGGCTCATTTCAT 3' 5' GTCACAATTCGGCCACCTAT 3'
31 e 32	319	5' GAACTGAGCTGGGTCCTGAT 3' 5' GCAGGAGAAGGCCAGAGTC 3'
33	286	5'AGGCTCAGGAAGCAGCTTTT3' 5' GCACAGAAGAGAAGGCAGGA 3'

3.8. Análise do gene DUOXA2

A análise da sequência do gene *DUOXA2* foi realizada em colaboração com o Dr. Hector Targovnik, do Hospital de Clínicas de Buenos Aires, Argentina, utilizando iniciadores e reações conforme descrito por Zamproni *et al.*, 2008.

3.9. Sequenciamento

Amostra de DNA foram sequenciadas para rastreamento de alterações nos genes envolvidos na síntese dos hormônios tireoideanos (*TPO*, *DUOX2* e *DUOXA2*) e para confirmar a construção dos plasmídios deste estudo, utilizando o equipamento ABI 377 (Applied Biosystems), aplicando o estojo comercial *DNA Sequencing Big Dye Terminator v 3.O Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems). Em todos os casos foram empregados os mesmo iniciadores utilizados na amplificação por PCR.

Os resultados foram analisados através da comparação da seqüência obtida com a disponível em banco de dados da internet (número de acesso TPO: *GenBank NT_* 000547)

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

A quantificação da TPO do RNAm no tecido tireoideano das pacientes II.7 e II.10 foi realizada por RT-PCR (PCR *transcriptase reversa*) quantitativo em tempo real, empregando-se o aparelho *Rotor-Gene 3000* (*Corbett*

Research, Mortlake, Austrália) e o estojo comercial *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, *Life Technologies,* Carlsbad, CA, EUA). Para esta análise, foram realizadas extrações de RNA total de amostras de tecido tireoidiano de ambas pacientes. Como controle, foram utilizadas amostras de RNAm extraídos de tecido tireoidiano não tumoral adjacente de 10 indivíduos.

Quantificou-se também a expressão dos genes: *TG*, *NIS*, *NKX2.1*, *PAX-8*, *rTSH* e *GAPDH* (gliceraldeido-3-fosfato desidrogenasse), este último foi utilizado como controle interno. As amostras foram aquecidas a 50°C e a 95°C por 2 minutos, seguidos de 45 ciclos de amplificação: 95°C por 20 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Os iniciadores empregados estão descritos na tabela 7. Para o cálculo da expressão gênica foi empregado o método de ΔΔCT (Applied *Biosystems*, *User Bulletin # 2, ABI Pism 7700 Sequence Detection System*, 1997).

Tabela 7: Iniciadores empregados na PCR em tempo real.

GENE	**INICIADOR *SENSE***	**INICIADOR *ANTISENSE***
GAPDH	5'GCTGGCATTGCCCTCA3'	5'GGCAGGGACTCCCCAG3'
TG	5'GAGCCCTACCTCTTCTGGCA3'	5'GAGGTCCTCATTCCTCAGCC3'
TPO (TP7)	5'CAGAGGCGTGAGCTGGAG 3'	5'AGGCTGGAAATCCCATCC3'
NIS	5'ACACTGACTGCGACCCTCTCCT3'	5'TGCTGAGGGTGCCACTGTAA3'
rTSH	5'CTTGCTGGACGTGTCTCAAA 3'	5'TAAGAAAGGTCAGCCCGTGT3'
PAX-8	5'GGCAGCGACAAGAGGAAAATGG3'	5'GTGGCGTGTTGGAAGGGGTCAG3'
TTF-1	5'CAGGACACCATGAGGAACAG 3'	5'GCCATGTTCTTGCTCACGTC3'

3.11. Construção dos plasmídios pTPO-95G e pTPO-95T

Para avaliar a função da alteração -95G>T presente na região promotora da TPO, identificada em homozigose nas pacientes II.7 e II.10, fragmentos de

DNA de 330pb ou 1260pb do promotor, contendo a alteração ou a sequência original foram amplificados por PCR, utilizando DNA de uma das pacientes e de um indivíduo controle que sabidamente não era portador da alteração.

O produto da reação de PCR foi tratado inicialmente com enzima *Klenow DNA polimerase* (Invitrogen, *Life Technologies*, Carlsbad, CA) e posteriormente com a enzima de restrição H*indIII* (Invitrogen, *Life Technologies*, Carlsbad, CA), seguindo o protocolo do fabricante. Esta etapa foi fundamental para orientação correta do inserto. O processo de clonagem completo está detalhado na figura 6.

Os fragmentos foram clonados no vetor PGL3-*basic* (Promega), que possui o gene repórter da luciferase *firefly*, tratado primeiramente com H*indIII* (Invitrogen, *Life Technologies*, Carlsbad, CA) e posteriormente com S*maI* (Invitrogen, *Life Technologies*, Carlsbad, CA), segundo protocolo do fabricante. O sistema de ligação foi montado para um volume final de 20µL, contendo uma proporção vetor/inserto de 1:30, 1µL de T4 DNA ligase *High concentration* (Invitrogen, *Life Technologies*, Carlsbad, CA) e 4µL de tampão 5X. A reação foi incubada a 16°C por 24 horas.

Posteriormente a bactéria *E. coli* JM109 foi transformada por eletroporação e a presença do inserto no DNA plasmidial nos clones recombinantes (spTPO-95G, spTPO-95T, xpTPO-95G e xpTPO-95T) foi confirmado por PCR e seqüenciamento (Figura 6).

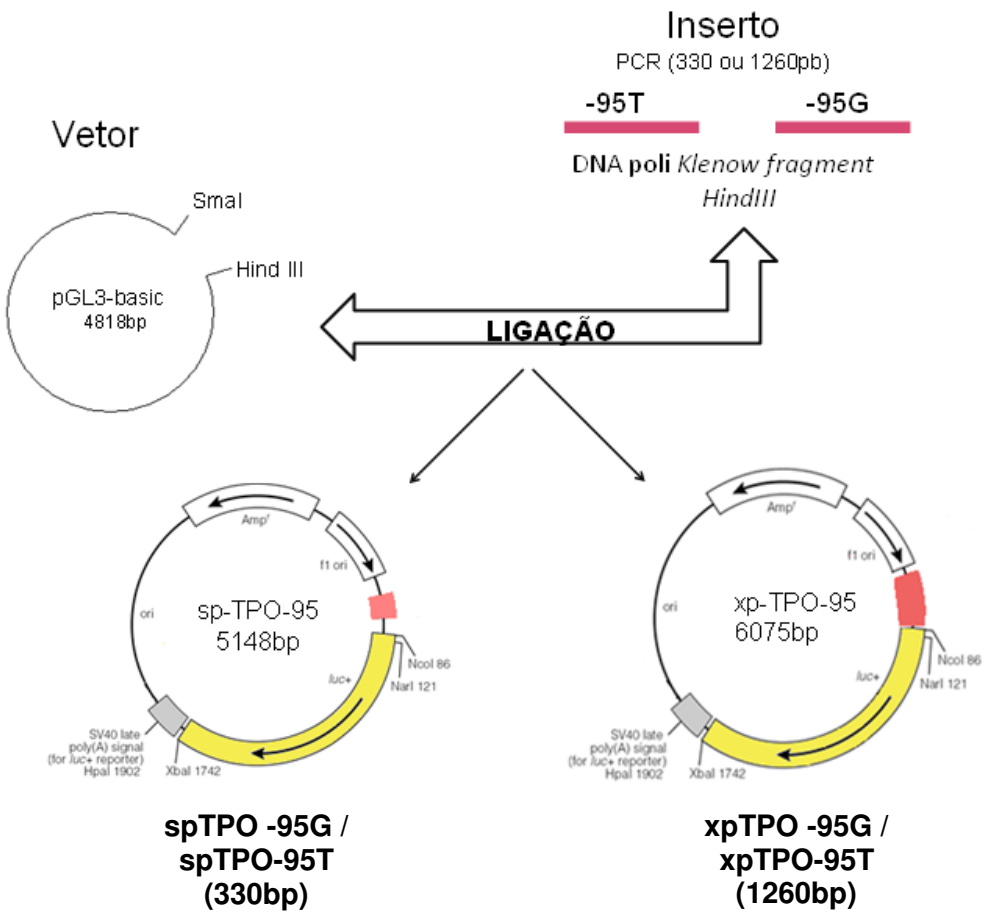


Figura 6: Representação das etapas da construção dos plasmídios spTPO-95G spTPO-95T, xpTPO-95G e xpTPO-95T, contendo o inserto de promotor da TPO (pTPO) de 330pb ou 1260pb *upstream* do gene da luciferase.

3.12. A mutação Q660E

A mutação Q660E (troca da glutamina na posição 660 por ácido glutâmico) provocada pela troca 2068C>G, no exon 11 do gene *TPO*, foi detectada anteriormente em pacientes brasileiros (Santos *et al,* 1999).

3.13. Construção dos plasmídios pcDNATPO-wt e pcDNATPO-660

Para realização do estudo funcional da mutação Q660E, foram construídos os plasmídios contendo o cDNA da TPO (pTPO-wt) e o cDNA da

TPO contendo a mutação 2068C>G (pTPO-660) sob ação de promotor forte de citomegalovirus (CMV) (Anexo 2).

3.13.1. Primeira Subclonagem do gene da *TPO*

Inicialmente foi necessário transferir o cDNA do gene *TPO,* selvagem, presente no plasmídio pALT-TPO, gentilmente cedido pela Dra. Hennie Bikker, para o plasmídio pUC18, para aumentar a eficiência da mutagênese sítio dirigida. Para isso, o plasmídio pALT-TPO foi tratado com as enzimas de restrição *EcoRI* e *Hin*dIII e o fragmento de 3,1 Kb foi eluído. O plasmídio pUC18 foi tratado também com as mesmas enzimas de restrição para torná-lo linear.

Após ligação de ambos os fragmentos de DNA com a enzima *T4 DNA ligase,* a mistura da reação foi empregada para transformar a bactéria *E.coli* JM109. Os clones recombinantes foram detectados através de reação de PCR utilizando iniciadores que amplificam o cDNA da TPO (Tabela 4).

3.13.2. Mutagênese Sítio Dirigida

A mutagênese sítio dirigida foi realizada utilizando o estojo *QuikChange Site Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene).

Para a reação de amplificação (PCR) foram adicionados: 120ng de DNA plasmidiano purificado, 125ng do iniciador mutagênico 1 (11-MUT sense 5´ TGTCTCATTGGGAAGGAGATGAAGGCTCTGC 3´); 125ng do inciador mutagênico 2 (11-MUT reverso

5´GCAGAGCCTTCATCTCCTTCCCAATGAGACA 3´); 1µl de dNTP 1µl da enzima *Pfu Turbo DNA polimerase*, para um volume final de reação de 50µl.

Inicialmente, o material foi incubado durante 30 segundos a 95°C, e posteriormente seguiram-se 12 ciclos de: 95°C durante 30 segundos; 55°C durante 1 minuto e 68 °C durante 12 minutos.

Após verificar a amplificação em gel de agarose 0,8%, o DNA foi digerido com a enzima de restrição *Dpn*I, que corta exclusivamente DNA metilado, ficando em solução o DNA sintetizado *in vitro* intacto com a seqüência nucleotídica alterada. Posteriormente, esse DNA foi empregado para transformar a bactéria JM109, selecionando-se as transformadas por resistência a ampicilina.

Para identificar o clone portador da mutação no gene da *TPO*, extraímos DNA plasmidiano de 10 clones, e realizamos seqüênciamento do exon 11 do gene da *TPO* empregando-se o iniciador 5TP6: 5´AATTCCAGCACCTTGGAT 3'.

3.13.3. Subclonagem final Do Gene *TPO* Mutado

Para a construção final dos plasmidio pTPO e pTPO-660, os genes *TPO*660 e o gene *TPO*-WT foram transferidos para o plasmídio pCMV-script (*Stratagene*) (Anexo 3). Para essa finalidade, trabalhos similares aos descritos na primeira subclongem foram realizados.

As características dos plasmídios construídos neste estudo estão apresentadas na tabela 8.

Tabela 8: Características dos plasmídios construídos neste estudo.

NOME PLASMÍDIO	MUTAÇÃO NA PROTEÍNA	BASE ALTERADA	LOCALIZAÇÃO	TAMANHO (BP) DO INSERTO DE TPO
pTPO	-	2068G	cDNA de TPO	3138
pTPO660	Q660E	2068G>C	cDNA de TPO	3138
spTPO-95G	-	-95G	Promotor TPO	330
spTPO-95T	-	-95T	Promotor TPO	330
xpTPO-95G	-	-95G	Promotor TPO	1260
xpTPO-95T	-	-95T	Promotor TPO	1260

3.14. Transformação de Bactérias por Eletroporação

Um litro de meio LB (1% triptona, 1% NaCl e 0,5% de extrato de levedura) foi inoculado com 10 mL de cultura de *E. coli* JM109, previamente crescida por 16 horas e incubada a 37°C, com uma agitação de 100 rpm, até apresentar Ab_{600} entre 0,5 a 0,8. As células foram sedimentadas, por centrifugação a 4°C, por 6 minutos, a 4.500 g, e ressuspendidas em 1L de água destilada estéril gelada. A seguir, as células foram novamente sedimentadas a 4°C, centrifugando-se por 10 minutos, a 4.500 g e ressuspendidas em 500 mL de água destilada estéril gelada. Centrifugou-se novamente, nas mesmas condições, para posteriormente ressuspender o sedimento em 20 mL de água destilada estéril, a 4°C.

Finalmente, a suspensão de células foi centrifugada durante 10 minutos, a 4.500 g, a 4°C, ressuspensa em glicerol 10% a 4°C num volume final de 2 a 3 mL e fracionada em alíquotas de 40 µL em tubo de microcentrífuga. Estes tubos foram estocados a -80°C.

Para cada transformação, uma alíquota de 40µL de células competentes foi descongelada, incubando-se em gelo, e adicionou-se de 1 a 2 µL de DNA plasmidial ou mistura de ligação. Esta mistura foi incubada em gelo por 1 minuto e posteriormente transferida para uma cubeta de eletroporação de 1 mL gelada. O pulso elétrico foi aplicado com o aparelho de eletroporação *Multiporator Eppendorf* calibrado para U 1700 V, τ 5,0, modo procariota. Logo após a aplicação do pulso elétrico, as células foram imediatamente ressuspensas em 1 mL de meio SOC (2% triptona, 2,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl2, 20 mM glicose), transferidas para um tubo estéril e incubadas durante 1 hora e 15 minutos, a 37°C, com agitação a 150 rpm. Finalmente, as células foram semeadas em placas contendo meio seletivo LB ágar-AP. (1% triptona, 1% NaCl, 0,5% de extrato de levedura, 2% agar e 1% de ampicilina). As placas foram incubadas a 37°C, por 12 horas.

3.15. Extração de DNA Plasmídial - "Mini-Prep"

Escolhemos a técnica "mini prep" por possibilitar a extração de DNA plasmidial a partir de baixo volume de cultura bacteriana. A extração de DNA plasmidial foi utilizada para confirmar construção dos plasmídios.

A extração foi realizada segundo Sambrook *et al.*, Vol 1, pág. 1.25 (1989), modificado. Foram inoculados 3 mL de meio LB (1% de ampicilina) com colônia bacteriana hospedeira do plasmídio desejado. A cultura foi crescida com aeração produzida por agitação de 125 rpm, a 37°C, durante 16 horas e centrifugada por 45 segundos, a 12.000 rpm. As células foram

ressuspensas em 0,3 mL de Solução I (Tris-HCl 25 mM, EDTA 1O mM, Glicose 5O mM, pH 8,O) e incubadas 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir, 0,3 mL de solução II (NaOH O,2 N, SDS 1%) foram adicionados e, após a incubação a $4^{O}C$ por 10 minutos, prosseguiu-se a adição de 0,3 mL de solução III (Acetato de sódio 3 M, Ácido acético 2 M, pH 4,8), seguida de incubação por 45 minutos a $4^{o}C$. Após nova centrifugação a 12.000 rpm, por 20 minutos, o sobrenadante foi transferido para tubo de microcentrífuga e adicionou-se 0,6 mL de clorofórmio: isoamílico (25:1). Após agitação do tubo, centrifugou-se por 1 minuto e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Foram adicionados 0,8 volumes de isoprapanol, incubou-se por 40 minutos a $4^{O}C$ e seguiu centrifugação a 12.000 rpm por 20 minutos, a $4^{O}C$. Após descartar o sobrenadante, foi adicionado 0,1 mL de etanol 80%. Seguiu-se centrifugação a 12.000 rpm por 2 minutos, a $4^{O}C$. Descartou-se o sobrenadante e o DNA foi secado e dissolvido em 50 µL de água estéril.

3.16. Extração de DNA Plasmídial - "Midi-Prep"

Este método foi utilizado para obtenção dos plasmídios já confirmados, utilizados nas transfecções. Esse método originou material com alta concentração, qualidade, e pureza.

Em 100 ml de meio LB, contendo o antibiótico específico (ampicilina ou kanamicina), foi inoculado um clone transformante (colônia bacteriana contendo o plasmídio em estudo) e incubado em agitador a 37° C por 12 horas.

A extração foi realizada de acordo com o protocolo do *Wizard Plus Midipreps; DNA Purification System* (Promega, Madison, WI).

3.17. Cultura de células

Neste trabalho foram utilizadas células de mamífero HEK293 (célula renal de embrião humano, gentilmente doada pelo Dr. Peter Kopp da *Northwestern University*) e células COS (célula renal de macaco).

As células HEK293 foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM - 4,500mg/L D-glucose, L-glutamina, hidrocloreto de prirdoxina, sem piruvato de sódio) (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), na presença de 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Gibco), em estufa a 37°C com 5% de CO_2. Para indução do AMPc, foi adicionado ao meio DMEN 0,4 µl de parascolina (Sigma) a 0,05 M.

As células COS foram cultivadas em meio RPMI (Gibco), suplementado com 5,6% de bicarbonato de sódio, 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco), na presença de 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Gibco), em estufa a 37° C com 5% de CO_2.

3.18. Transfecção de célula de mamífero

As células foram transfectadas através do método de cloreto de cálcio. Foram misturados 19,8 µL de $CaCl_2$ (2,5M) e concentração específica de cada plasmídio. Estas soluções foram agitadas a 25°C por 30 segundos. Logo após, foram adicionados vagarosamente 300 µL de HBS 1X [HBS 2X: 5 g de HEPES 1M (Invitrogen, *Life Technologies*, Carlsbad, CA, EUA), 8 g

de NaCl; 1 g de dextrose; 0,37 g de KCl; 0,099 g de $Na_2HPO_4.7H_2O$, água q.s.p 500 mL e pH 7,2]. Incubou-se por 10 minutos a 25°C e todo o volume foi transferido para as placas contendo as células.

Quando necessário, realizamos a cotransfecção de células de mamíferos, utilizando de 3000 a 4000 ng de pTPO-95G ou pTPO-95T com 50 ng de pRL-CMV, contendo a luciferase *Renilla*. Também foram realizadas contransfecções com o plasmídio pCDNA contendo os genes *PAX8* ou *NKX2.1*, gentilmente cedidos pelo Dr Roberto Di Lauro, da Universidade Federico II de Nápoles, Itália.

3.19. Células estabilizadas

Para o estudo funcional da mutação Q660E, visando aumentar a expressão de TPO, as células COS transfectadas com os plamídios TPO-660 e pTPO foram selecionadas e estabilizadas acrescentando o antibiótico geneticina / G418 (Gibco) no meio de cultura.

Após 24 horas da transfecção, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com 1ml de PBS. Posteriormente foi adicionado novo meio de cultura RPMI, contendo 10% de soro fetal bovino, na presença de 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina e 400 µg/ml do antibiótico geneticina (G418).

3.20. Extração de RNA

Amostras de RNA total foram extraídas a partir de células transfectadas ou de amostra de tecido tireoideano.

- Para a extração da cultura de células, retirou-se todo o meio de cultura e lavou as células com 1 mL de PBS (Gibco) e após retirar todo o PBS , foi adicionado 1 mL de Trizol (Invitrogen, *Life Technologies*, Carlsbad, CA). As células foram lisadas utilizando equipamento apropriado (*Scrapper cells,* TPP). O material foi transferido para tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e homogeneizado por 10 segundos. Após incubação por 5 minutos em temperatura ambiente, adicionou-se 266ul de clorofórmio, agitou-se por 15 segundos e incubou-se por 15 minutos em temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa em suspensão foi transferida para outro tubo de 1,5 mL onde foi adicionado 666µL de álcool isopropílico. O material foi incubado a -20°C por 10 minutos, e posteriormente, centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase líquida foi desprezada e foi adicionado 1ml de etanol 75%. Após nova centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C, manteve-se somente o sedimento que foi seco e ressuspenso em 20 µL de água DEPC. O RNA foi conservado a -80°C até sua utilização.
- Para extração do RNA de tecido, pulverizou-se 50 a 100mg de tecido congelado em nitrogênio líquido por 1 a 2 minutos no equipamento *Mikro dismembrator U* (B. Braun Biotech Internacional, Allentown, PA). Em seguida, acrescentou-se 1mL de Trizol (Invitrogen, *Life Technologies*, Carlsbad, CA) e homogeneizou-se por 10 segundos. O material foi transferido para tubo de 1,5 mL e incubado por 5 minutos a 25ºC. Adicionou-se 200 µL de clorofórmio, agitou-se por 15 segundos e incubou-se por 15 minutos a 25ºC. Centrifugou-se a 12.000 rpm por 15 minutos a 4ºC, e a fase

aquosa em suspensão foi transferida para outro tubo de 1,5 mL onde 500 µL de álcool isopropílico foram adicionados. O material foi incubado a -20ºC por 30 minutos, e posteriormente, centrifugado a 12.000 rpm por 20 minutos a 4ºC. A fase líquida foi desprezada e 500 µL de etanol 70% foram adicionados. Após nova centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4ºC, o sedimento foi seco e ressuspenso em 20µL de água. O RNA foi conservado a -80ºC até sua utilização.

3.21. Síntese de cDNA

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

3.22. Avaliação da atividade da Tireoperoxidase

A atividade enzimática da TPO foi avaliada pelo método de oxidação de iodeto. Esse teste baseia-se na atividade de geração de triiodeto (I^{-3}) a partir da oxidação do iodeto na presença de quantidades constantes de H_2O_2, geradas pelo sistema glicose-glicose oxidase (Figura 5) (Nakashima e Taurog 1978; Moura et al., 1989).

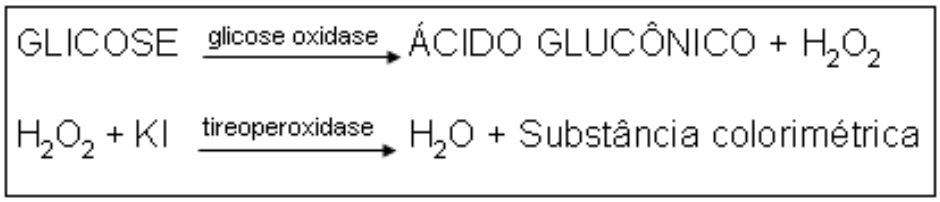


Figura 7: Reações que ocorrem durante o teste de oxidação de iodeto.

Para avaliar a atividade da TPO em células estáveis, utilizamos o tampão RIPPA (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150mM NaCl; 1% Igepal CA-360; 0,25% de *sodium deoxycholate*; 0,1% de SDS 10%; 1 mM EDTA pH 8,0 e água q.s.p.10 mL) para lise celular.

Para a lise celular, as células transfectadas foram lavadas com 1 mL de PBS gelado, após retirada de todo o volume, foi adicionado 600 µL de RIPPA tampão com 1 mM de inibidor de protease (Complete mini 100 mg/mL, EDTA free – Roche Diagnósticos LTDA). As células foram lisadas com auxílio de instrumento apropriado (*Cell scraper*- TPP) e todo o volume foi colocado em tubo de 1,5 mL e incubado em gelo por 15 minutos. O produto da lise celular foi homogeneizado em agitador orbital por 15 minutos a 4°C, e centrifugado a 13.500 rpm por 15 minutos a 4°C. Todo o sobrenadante foi transferido para tubo de 1,5 mL e estocado a – 80°C.

3.22.1. Teste de oxidação de iodeto

Em uma cubeta de 3 mL, adicionou-se 1 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, contendo 24 mM de KI e 11 mM de glicose, com diferentes volumes de lisado celular (50 a 300 µl). O volume final da reação (2 mL) foi completado com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4, e a

reação foi iniciada com adição de 10 µl de glicose-oxidase (1 mg/mL). O aumento da absorbância a 353 nm (Dabs353) foi monitorado, de 1 a 4 minutos, em espectofotômetro. O cálculo da atividade foi feito a partir da variação da absorbância por minuto (Dabs353/min) em função do volume de amostra utilizado, sendo usada a porção linear para determinar, através da regressão linear, a velocidade de geração do triiodeto (I^{-3}) em função do volume utilizado nas preparações (Dabs353nm/min.mL).

Posteriormente foram calculados os valores de atividade enzimática especifica, dividindo a atividade protéica pela concentração de proteína (Figura 6).

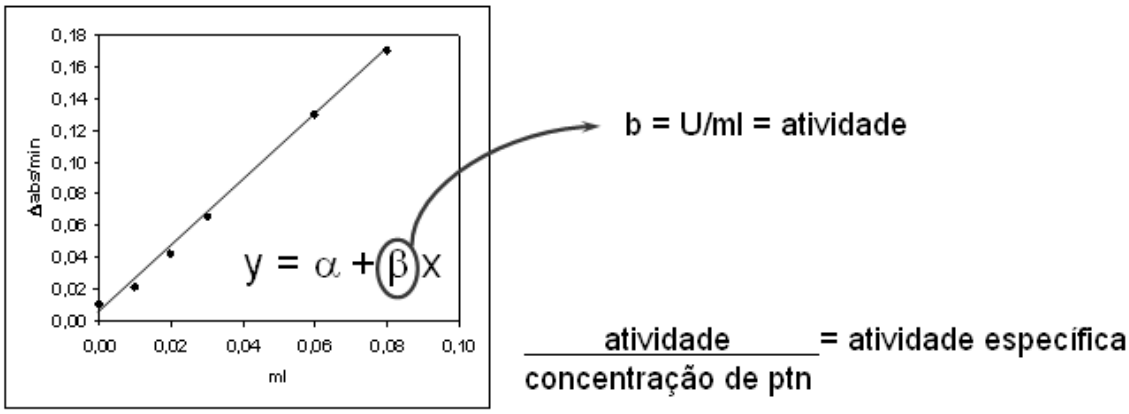


Figura 8: Cálculo da atividade específica da TPO através do método de oxidação de iodeto, onde o coeficiente b corresponde a atividade da enzima

3.23. Teste para avaliação de atividade de luciferase

Após 48 horas da cotransfecção o sobrenadante foi retirado e as células foram lavadas com 500 µl de PBS. Após a retirada da solução de lavagem foi adicionado 250 µl de *passive lyses buffer* (*Dual-Luciferase Repórter Assay System* - Promega). As células foram lisadas com auxílio de instrumento apropriado (*Cell scraper*- TPP) e todo o volume foi transferido

para tubo de microcentrífuga. O produto de lise foi centrifugado por 30 segundos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para novo tubo de microcentrífuga.

Para fazer a leitura da emissão de luz da luciferase, em tubo de microcentrífuga de 2ml foi colocado 100 µl de Luciferase Assay Reagent II e 20 µl do lisado celular, sem agitar. A leitura da luciferase *firefly* foi realizada em luminometro (TD-20/20 Luminometer - DRL Ready) e em seguida, foi adicionado 100 µl de *Stop & Glo Reagent* (*Dual-Luciferase Repórter Assay System* - Promega) e realizada leitura da emissão da lucirefase *renilla*.

3.24. Análise estatística

O programa *MINITAB 15* foi empregado para a análise descritiva e estatística dos resultados.

O teste Anova (*One way)* com post teste de Bonferroni foi usado para analisar os dados de expressão da luciferase nos experimentos que avaliaram a atividade do promotor de TPO.

Para este estudo, consideramos valores de alfa ≤ 0,05 estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação funcional da mutação Q660E

A mutação Q660E foi identificada em pacientes brasileiros, em estudos anteriores (Santos *et al.*, 1999; Neves SC, 2008). Para avaliar o efeito da mutação na atividade da TPO foram construídos dois vetores de expressão, pTPO (portador do cDNA da TPO normal - 3138bp) e pTPO660 portador da alteração 2068G>C (mutação Q660E). Posteriormente, suas sequencias foram confirmadas por seqüenciamento (Figura 9).

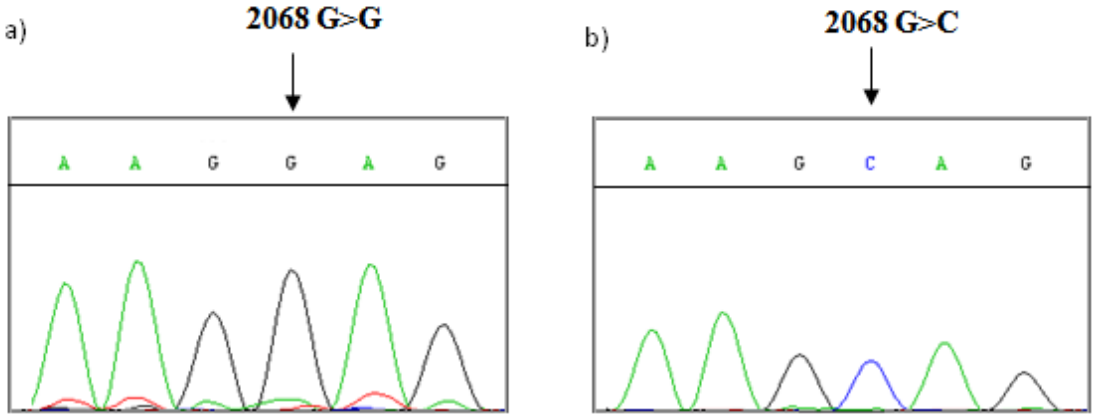


Figura 9: Cromatograma do sequenciamento de: a) pTPO contendo o cDNA da TPO selvagem; b) pTPO660 com a alteração 2068G>C.

Nenhum dos 65 indivíduos sem alterações nas funções tireoideanas analisados apresentou a mutação Q660E.

4.1.1. Expressão de TPO e TPO660 em células de mamíferos

Células COS transfectadas com plasmídios pTPO e pTPO660 na presença de geneticina foram estabilizadas e usadas para avaliação do efeito desta mutação. A amplificação de banda de 396bp na reação de RT-

PCR utilizando iniciadores específicos de cDNA da TPO (3TP3/5TP3), confirmou a expressão de TPO nas células transfectadas (Figura 10).

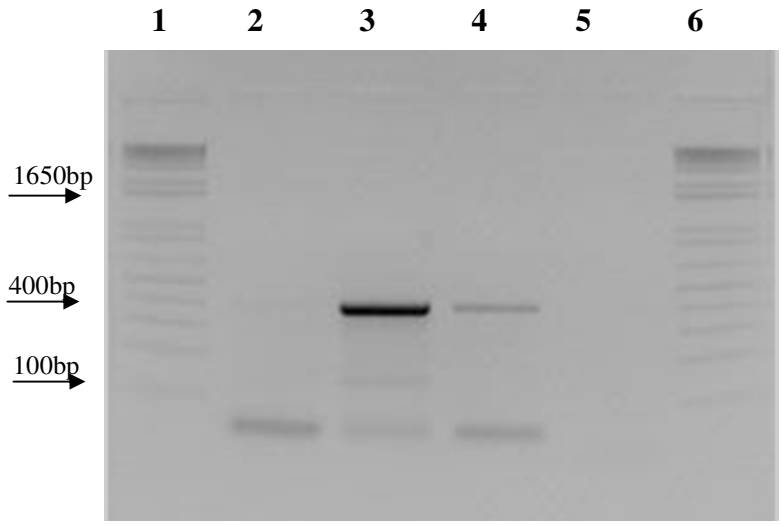


Figura 10: Gel de agarose 1,5% com amplificação do cDNA das células transfectadas com: **1 e 6-** marcador de peso molecular 1Kb *ladder plus*, **2-** vetor pCMV (controle negativo da transfecção); **3-** spTPO; **4-** spTPO660; **5-** controle negativo da reação de PCR.

4.1.2. Avaliação da atividade de TPO

A atividade da tireoperoxidase (TPO e TPO-Q660E) foi analisada empregando-se teste de oxidação de iodeto utilizando diferentes volumes de lisado (20 a 200µl) das culturas celulares. Os valores obtidos do teste de oxidação do iodeto das células: não transfectadas (COS), transfectadas com o vetor PCMV, com pTPO e com pTPO660E estão mostrados na tabela 9.

Tabela 9: Valores obtidos no teste de oxidação de iodeto, a partir de lisado celular de células não transfectadas (COS), transfectadas com o vetor PCMV, com pTPO e com pTPO660E.

CULTURA	MÉDIA (ABS/MIN)	ERRO PADRÃO	DESVIO PADRÃO	MIN – MAX
COS [a]	0,076	0,014	0,040	0,030 – 0,118
COS/PCMV [b]	0,122	0,002	0,006	0,114 – 0,133
COS/pTPO [c]	0,111	0,009	0,042	0,045 – 0,195
COS/pTPO660E [d]	0,108	0,010	0,469	0,040 – 0,199

a x b: p= 0,015 ; a x c: p= 0,062 ; a x d: p= 0,088; b x c: p = 0,258; b x d: p= 0,209; c x d: p= 0,852. Teste t (two sample t test). Intervalo de confiança de 95%.

Células contendo o vetor PCMV apresentaram valores de oxidação comparáveis aos obtidos nas células contendo pTPO e pTPO660E (Tabela 10).

Não se observou diferenças nos valores de oxidação nas diferentes culturas utilizando volumes diferentes de lisado celular (20µl, 40µl, 80µl, 100µl, 160µl e 200µl) (Figura 11).

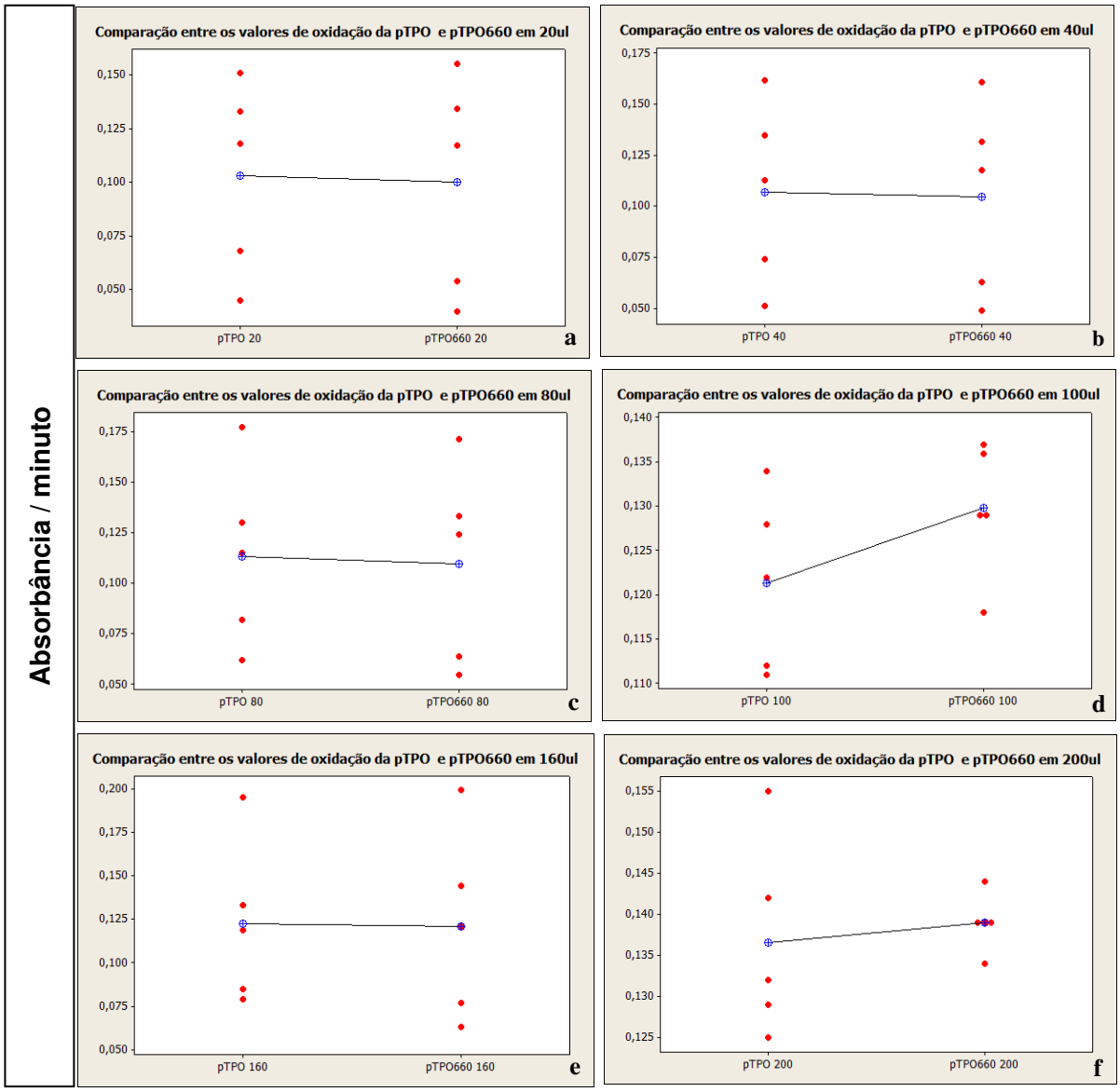


Figura 11: Valores médios (± erro padrão) da oxidação de iodeto (Abs/min) nas células transfectadas com plasmídios TPO e TPO-Q660E quando comparados (a) 20µl de lisado celular, (b) 40µl de lisado celular, (c) 80µl de lisado celular, (d) 100µl de lisado celular, (e) 160µl de lisado celular e (f) 200µl de lisado celular.

4.2. Avaliação funcional da ALTERAÇÃO -95G>T

4.2.1. Avaliação da função tireoideana

A função tireoideana dos sujeitos desse estudo foi confirmada através das dosagens de TSH; T4 total; T4 livre e TG séricas, confirmando o HC com DPII (Tabela 12).

Tabela 10: Dados laboratoriais das pacientes portadoras de HC e bócio.

PACIENTES	TSH (UU/ML)	TT4 (UG/DL)	TT3 (UG/DL)	TG (NG/ML)	BÓCIO (GLÂNDULA AUMENTADA EM)	DESCARGA DE PERCLORATO (%)
II.7	9,5	7,1	160	51,4	2 a 3 vezes	48
II.10	3,5	8	160	80,4	3 a 4 vezes	74
Referência	5 - 4,5	4/nov	0,7 - 1,7	mai/30	-	<15

4.2.2. Rastreamento de mutações em pacientes com HC e DPII

A presença de mutações nos genes *TPO*, *DUOX* e *DUOXA2* das duas pacientes foi pesquisada por seqüenciamento.

A troca -95G>T em homozigose na região promotora do gene da T*PO* foi a única alteração identificada. Não foram encontradas outras mutações na região codificante, nas bordas intron/exons e em enhancer (posição -5,5Kb) deste gene. Tampouco foram localizadas alterações na sequencia dos genes *DUOX2* e *DUOXA2*. Esta alteração estava presente em 10 dos 15 familiares não afetados pesquisados, todos em heterozigose (Figura 12).

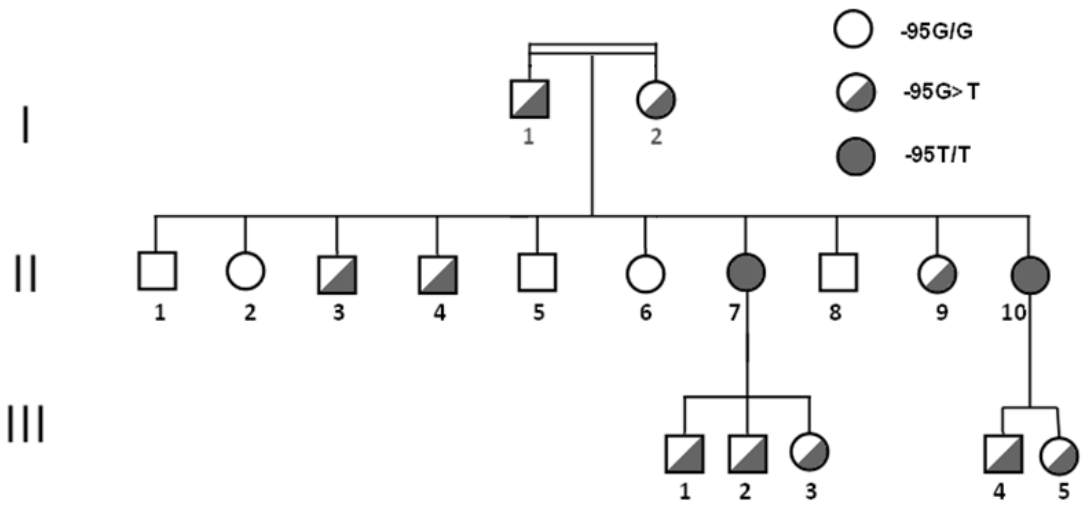


Figura 12: Heredograma representando familiares das pacientes II.7 e II.10, portadoras da alteração -95G>T em homozigose.

4.2.4. O polimorfismo -95G>T na População Não Afetada

A presença desta alteração -95G>T foi avaliada também em 126 indivíduos controles sem alterações nas funções tireoidianas. A alteração foi identificada, em heterozigose, em 19,1% (10 familiares e 17 não familiares - 27/141) e em 1,42% (2 indivíduos controles 2/141) em homozigose.

Polimorfismos do gene TPO e DUOX2

Vários polimorfismos foram identificados polimorfismos no gene TPO em ambas pacientes, assim como no gene DUOX2 (tabela 11)

Tabela 11: Polimorfismos identificados no gene da *TPO* e DUOX2 em pacientes com hipotireoidismo congênito

	PACIENTES	
EXON DO GENE TPO	**II.7**	**II.10**
Região promotora	-95G>T	-95G>T
3	-21G>C (Intron) InsGGT16 (Intron)	-21G>C (Intron) InsGGT16 (Intron)
4	31 T>C (Intron) -46 A>C (Intron)	31 T>C (Iintron)
7	-42 G>A (Intron)	-42 G>A (Intron)
9	+19insA(Homo)	
EXON DO GENE DUOX2		
4	413C>T, homo, P100L	413C>T, het, P100L
5	558C>T, het 567C>T, het 597 G>C, het 598 G>C, homo G131R 633 G>T, het	558C>T, het 567C>T, homo 597 G>C, het 598 G>C, homo G131R 633 G>T, het
10	-72A>T, het	-72A>T, het
12	1461 G>C, homo	1461 G>C, homo
14	+65 C>A, homo	+65 C>A, homo
24	3220 C>T, homo	3220 C>T, homo
25	+15 T>A, homo	+15 T>A, homo

4.3.5. Quantificação da expressão gênica em tecido tireoidiano

Foi avaliada a expressão de genes específicos da tireoide nos tecidos das pacientes em estudo, Verificou-se diminuição da expressão dos genes *TPO, PAX8* e *NKX2.1* nos tecidos afetados quando comparada com a expressão nos tecidos controles, ainda, foi possível verificar aumento na expressão da *TG*, *NIS*, r*TSH* e *PDS* (Tabela 12, Figura 13).

Tabela 12: Expressão dos genes específicos da tireóide das pacientes II.7 e II.10 (valores expressos em porcentagem, comparados com tecidos controles).

	TPO	PAX8	NKX2.1	NIS	RTSH	TG	PDS
II.7	- 38%	-47,1%	- 18,7%	+17,7%	+47,1%	+289,6%	+420,7%
II.10	-38,1%	- 33,1%	-67,7%	+72,8%	+93,5%	+161,5%	+41,4%

+: aumento; - diminuição

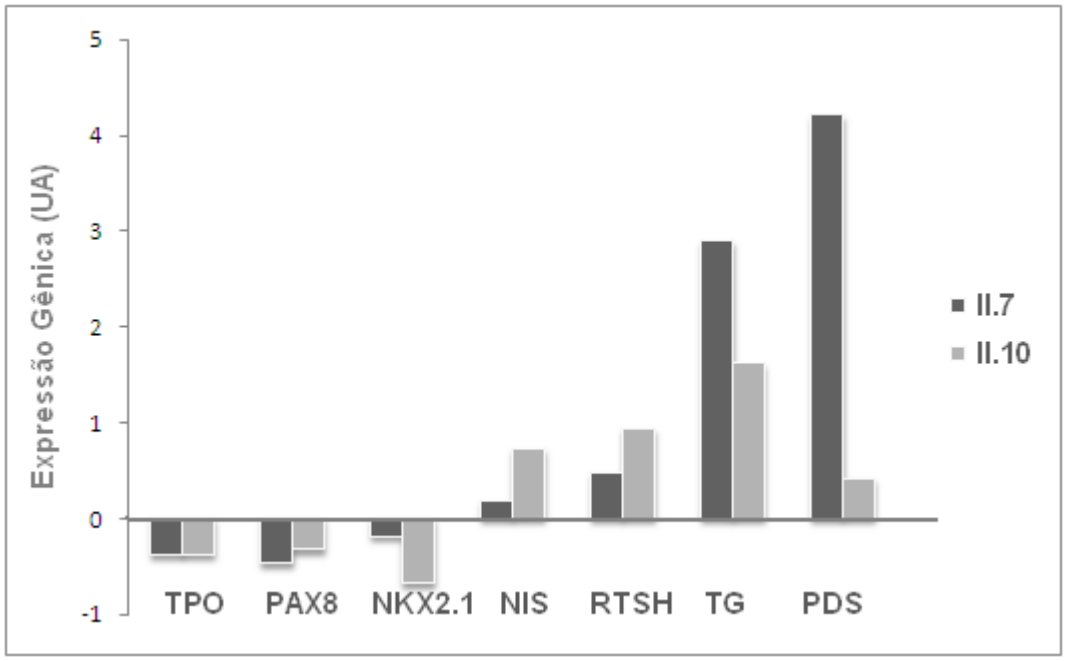


Figura 13: Expressão gênica (em unidades arbitrárias -UA) no tecido das pacientes com HC, DPII e bócio. observou-se redução da expressão dos genes *TPO*, *PAX-8*, *NKX2.1* e aumento da expressão dos genes *NIS*, r*TSH*, *TG* e *PDS* em relação a expressão em tecidos tireoideanos controles (0 UA).

4.2.6. Avaliação da Atividade TPO em Tecido Tireoideano

O teste de oxidação de iodeto, para avaliar a atividade de TPO no tecido tireoideano das pacientes afetadas II.7 e II.10, mostrou diminuição da atividade enzimática da TPO em 70 e 50%, respectivamente, quando comparada com a atividade do tecido controle (sem alterações tireoidianas) (Tabela 13, Figura 14).

Tabela 13: Valores da atividade da TPO em amostras de tecido das pacientes portadoras da alteração -95G>T e de tecido tireoidiano controle (sem alterações tireoidianas).

	ATIVIDADE DA TPO (U/G DE PROTEÍNA)
II.7	186,3
II.10	299,0
Tecido controle	589 ± 136

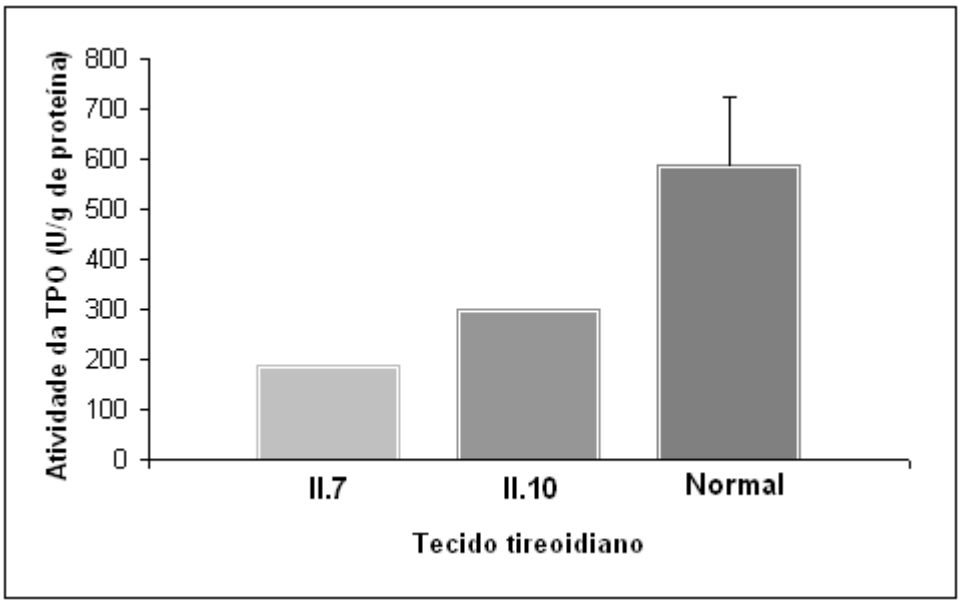


Figura 14: Atividade enzimática da TPO em tecido tireoidiana observou-se redução da atividade nas amostras das pacientes portadoras da alteração -95G>T quando comparada à de tecido tireoidiano controle (sem alterações tireoidianas).

4.2.7. Estudo funcional, *in vitro*, de região promotora da TPO

Para avaliar o efeito da presença do polimorfismo -95G>T no promotor do gene TPO fragmentos de 330pb e 1260pb deste promotor foram clonados *upstream* do gene repórter luciferase. Os plasmidios resultantes foram: spTPO-95T (330bp) e spTPO-95G (330bp), xpTPO-95T (1260bp) e xpTPO-95G (1260bp), cujos insertos foram confirmados por seqüenciamento (Figura 15).

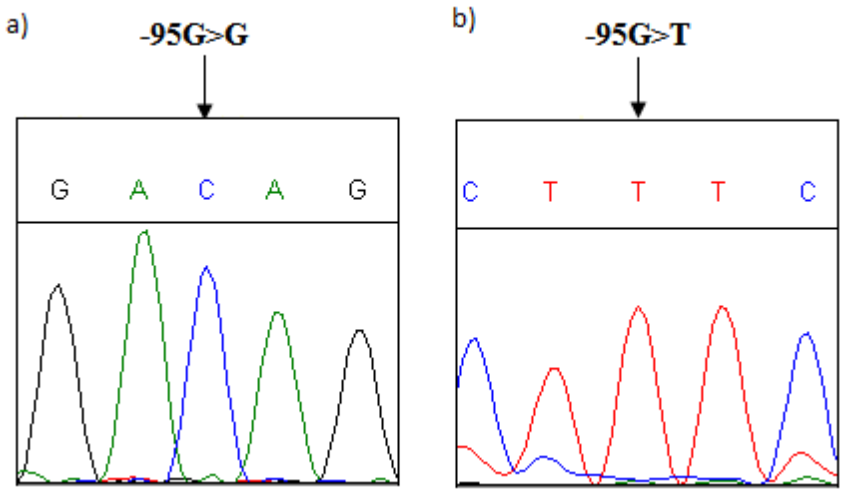


Figura 15: Cromatograma do sequenciamento de a) plasmídio xpTPO-95G e spTPO-95G, portadores de fragmento do promotor do gene TPO selvagem, contendo G na posição -95 (seqüência reversa) e b) plasmídio xpTPO-95T e spTPO-95T portadores de fragmento do promotor do gene TPO mutado, contendo T na posição -95 do promotor da TPO.

Inicialmente, foi avaliado o efeito da alteração -95G>T, em ensaios independentes, utilizando os plasmídios spTPO-95G e spTPO-95T, contendo 330bp de região promotora da TPO e o pGL3basic como controle negativo. Não foram observadas diferenças na expressão da luciferase entre as células cotransfectadas (figura 16), indicando que a região promotora clonada, independentemente da base na posição -95, não promoveram a expressão do gene repórter.

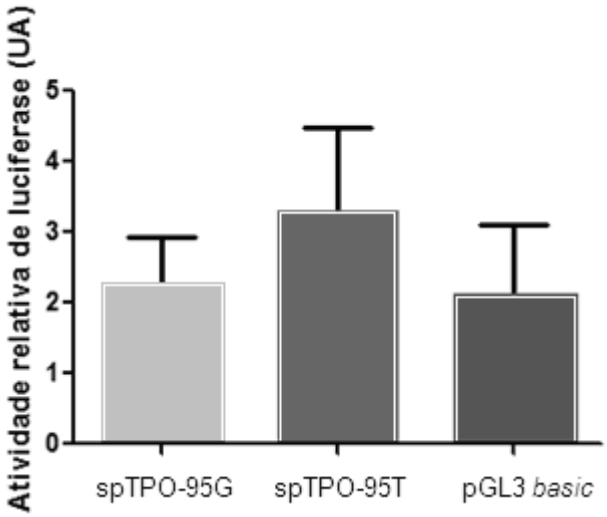


Figura 16: Expressão da luciferase sob ação da região promotora da TPO de 330bp com e sem a alteração -95G>T, utilizando os plasmídios spTPO-95G, spTPO-95T, respectivamente. O vetor pGL3-*basic* foi utilizado como controle negativo.

Posteriormente foram realizados ensaios utilizando os plasmídios contedo fragmentos de 1260bp do promotor (xpTPO-95G e xpTPO-95T). Verificou-se que ambas sequencias promotoras (contendo -95G ou -95T) foram capazes de promover a síntese da luciferase, sendo a expressão do clone xpTPO-95T estatísticamente mais elevada (p=0,013) que a do pGL3basic. Por outro lado não se observaram diferenças estatísticas entre a atividade da região promotora do clone xpTPO-95G e a do xpTPO-95T (Figura 17).

Foi então avaliado o efeito da alteração na presença de fatores de transcrição específicos da tireóide neste sistema de expressão. Para isso foram empregados plasmidios que expressam NKX2.1 e PAX8 nas co-transfecções. Verificou-se que a atividade da região promotora do xpTPO-95T apresentou uma drástica diminuição da sua atividade, quando comparada com a atividade do clone com xpTPO-95G (p=0,0037) assim

como com o clone xpTPO-95T sem os fatores de transcrição (p=.0,021) (Figura 17).

Por outro lado, a atividade da região promotora xpTPO-95G foi similar na presença ou ausência dos fatores de transcrição (Figura 17).

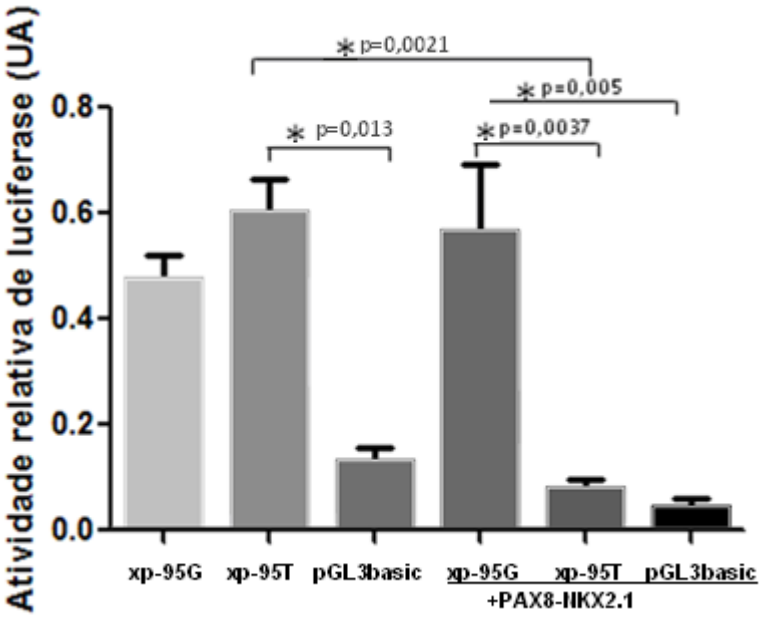


Figura 17: Expressão do gene da luciferase com ação dos promotores xpTPO-95T e xpTPO-95G, na presença ou não de fatores de transcrição NKX2.1 e PAX8R. Observou-se importante redução da atividade da região promotora com alteração -95G>T na presença de PAX8 e NKX2.1 (p=0,021).

4.2.8. Análise *in silico* do promotor de TPO

Para verificar a presença de sítios de ligação de fatores de transcrição na região do promotor de TPO que inclui a posição -95 foram feita análise *in silico* através do programa TFSEARCH. Foi possível verificar a existência de vários sítios para fatores de restrição nesta região (Figura 18).

```
-198 AGGCTGGACT GCATGTGGAC CCCGATGACA TGGCACTTTG TTTCTGACCA
                                                <-------      SRY 100.0
                                                     <----    HSF 100.0
                          <------                             ADR1 98.5
                  <-------                                    USF 90.8
     -------                                                  cap 88.0
        <--------                                             cap 87.6
                               <----------                    MATalp 86.1
                                                       --------CCAAT 85.9
                                    <--------------            Oct-1 85.7
                                                         ------NF-Y 85.7
                           <------------                      Skn-1 85.2

-148 GTCAGGACAC ACAAGAGGCC CGGCGCAAAC ACAACAAAGC CCGCAGACAT
                                                            <-HSF 95.4
                                  -------->                   SRY 92.7
     --->                                                     CCAAT 85.9
     ---->                                                    NF-Y 85.7

-98 TCTGTCCCCA CGAAGAACGG ACGCCACTCG ACTTCCTAGC ATCTTGACGG
                   ---->                                      HSF 100.0
         <--------                                            MZF1 95.7
    ---                                                       HSF 95.4
         <-----                                               ADR1 93.8
                                                         <    GATA-2 89.3
                   ---------->                                v-Myb 88.3
                ---->                                         HSF 86.5
                                     --------->               GCR1 86.4

-48 GCTATCCAAG CGCGGAGTCA GTTTATAAGG TGGGTAACCA AGTCCCTGGA
                                                            - Ftz 97.6
                  ----->                                      ADR1 92.3
                                <-----------                  deltaE 91.5
                        -------->                             cap 91.0
                   <----------                                GCN4 89.8
    ---------                                                 GATA-2 89.3
                                                          <-- Ubx 88.9
      ----->                                                  NIT2 88.8
                  <-----------                                AP-1 88.7
                        <----------                           c-Myb 88.7
                                                          --- S8 88.0
                             ------>                          CdxA 87.9

+18 AGGCAATTAA GGCGCCCATT TCAGAAGAGT TACAGCCGTG AAAATTACTC
       <--------                                              Nkx-2. 100
    ----------->                                              Ftz 97.6
                               ---->                          HSF 95.3
                                                 -------------- Dfd 93.4
                                                       <------ NF-E2 90.1
                                                            -- cap 89.4
                                                       ------- AP-1 89.2
    -----------------                                         Ubx 88.9
    ------------->                                            S8 88.0
```

Figura 18: Análise *in silico* para da região promotora de TPO para determinar possíveis ligações de fatores de transcrição. Em destaque a posição -95.

5. DISCUSSÃO

O HC é caracterizado pelo hipofuncionamento da síntese dos hormônios tireoidianos ocorrendo em 1:2500 nascidos vivos. (Medeiros G, 2003, Carranza *et al.*, 2006). Umas das causas é a presença de mutações em proteínas participantes da biossíntese dos hormônios tireoideanos, nesse contexto, alterações no gene da TPO são as mais comumente encontradas (Rubió & Medeiros-Neto, 2002; Knobel & Medeiros, 2003).

Entre as alterações do gene *TPO*, a mutação Q660E (2068C>G) no exon 11 foi detectada em quatro famílias brasileiras, cujos pacientes apresentavam defeito parcial de incorporação de iodeto (Santos *et al.*, 1999; Neves SC, 2008), quatro famílias portuguesas (Rodrigues *et al.*, 2005) e em uma família de origem franco-canadense (Deladöey *et al.*, 2008) conforme mostrado na tabela 15.

Tabela 15: Descrição de pacientes portadores da mutação Q660E, em heterozigose composta com demais mutações.

PACIENTE	1ª MUTAÇÃO	DESCARGA DO PERCLORATO (%)	2ª MUTAÇÃO	AUTOR
I	Q660E	62%	Gly319Glu	Neves SC, 2008
II	Q660E	48,2%	Cis838Ser	Neves SC, 2008
III.1	Q660E	62%	R396fsX76	Santos *et al.*, 1999
III.2	Q660E	68%	R396fsX76	Santos *et al.*, 1999
III.3	Q660E	67%	R396fsX76	Santos *et al.*, 1999
III.4	Q660E	61%	R396fsX76	Santos *et al.*, 1999
IV.1	Q660E	66%	C808fsX71	Santos *et al.*, 1999
IV.2	Q660E	75%	C808fsX71	Santos *et al.*, 1999
V.1	Q660E	-	Phe653Valfs15X	Deladöey *et al.*, 2008
V.2	Q660E	-	Pro499Argfs2X	Deladöey *et al.*, 2008
VI.1	Q660E	-	R396fsX76	Rodrigues *et al.*, 2005
VI.2	Q660E	-	R396fsX76	Rodrigues *et al.*, 2005
VII	Q660E	-	N425S	Rodrigues *et al.*, 2005
VIII.1	Q660E	-	2748G>A (r.spl.?)	Rodrigues *et al.*, 2005
VIII.2	Q660E	-	2748G>A (r.spl.?)	Rodrigues *et al.*, 2005
IX	Q660E	-	Q660E	Rodrigues *et al.*, 2005

Em 2008, Deladoëy *et al.*, estudaram a localização das proteínas mutadas (**Q660E**/Phe653Valfs15X) através de análise imunohistoquimica de tecido tireoidiano e demonstraram que a proteína mutada TPO-Q660 não sofre modificações conformacionais e permanece localizada na membrana apical. Também determinaram que a estrutura das proteínas TPO e TPO-Q660E são estáveis tendo em vista a semelhança das estruturas tridimensionais (Deladoëy *et al.*, 2008).

Estudos *in silico* indicam que tanto o aminoácido 660 como sua respectiva região de localização são altamente conservados em diferentes espécies assim, acredita-se que tal mutação possa ser capaz de alterar a função e/ou a estrutura protéica (Santos *et al.*, 1999; Deladöey *et al.*, 2008).

Outro aspecto que deve ser levado em conta refere-se à carga dos aminoácidos. Em 2007, Rivolta *et al.* sugeriram que este aspecto poderia interferir seriamente na atividade da TPO, já que a mutação parece acarretar a troca de um aminoácido neutro (glutamina) por um aminoácido com teor ácido (ácido glutâmico).

Esses achados corroboraram para a realização de um estudo funcional da proteína TPO-Q660E, um dos objetivos do nosso trabalho. Após confirmação da construção dos plasmídios pTPO e pTPO660, realizamos ensaios de oxidação de iodeto, utilizando amostras de lisado provenientes de culturas celulares de COS, COS-pCMV, COS-pTPO e COS-pTPO660. Ao analisarmos os valores encontrados observamos grande semelhança entre eles. Levantamos então a possibilidade de baixa eficiência no teste de oxidação de iodeto das amostras de lisado de cultura celular, devido a baixa

concentração da proteína. Anteriormente, este teste foi descrito na literatura para análise da atividade da TPO em tecido tireoidiano (Ferreira et al. 2006).

Os primeiros experimentos foram realizados em cultura celular transiente, optamos então por estabilizar os plasmídios nas culturas celulares com o intuito de aumentar a quantidade de proteína. Porém, também não foi possível determinar diferença nos valores de oxidação de iodeto entre as proteínas selvagem e mutada com essa metodologia. Para obter resultados conclusivos da atividade da TPO-Q660E, será necessário aumentar ainda mais a sensibilidade do teste de oxidação, com mudanças de protocolo, ou empregar outra técnica.

O segundo objetivo do nosso trabalho foi caracterizar o perfil molecular de pacientes portadoras de hipotireoidismo congênito, com defeito parcial de incorporação de iodeto e bócio. O HC das pacientes foi confirmado em exames para avaliação da função tireoidiana (aumento do valor de TSH sérico e redução dos valores dos hormônios tireoidianos T3 e T4) (Park and Chatterjee, 2005).

Quando o HC é causado por mutações envolvidas na síntese hormonal geralmente acarreta presença de bócio (Nunez *et al.,* 1982)

Já o defeito parcial de incorporação de iodeto (50-70% de descarga no teste de perclorato) sugere que a doença seja causada por alterações nos genes responsáveis pela organificação do iodo assim, para responder ao segundo do trabalho foi realizado o rastreamento de mutações nos genes *TPO*, *DUOX2* e *DUOXA2*, cujas mutações foram associadas anteriormente a

fenótipos semelhantes aos das pacientes em estudo (Nascimento *et al.*, 2003; Grasberger & Refetoff, 2006; Moreno *et al.*, 2008).

Não foram identificadas mutações na região codificante, nas bordas intron/exons, em mais de 2000pb do promotor e região *enhancer* localizada a 5,5kb do sítio de início de transcrição do gene *TPO*. Também não foi possível identificar mutações nos genes *DUOX2* e *DUOXA2.* Foram detectados apenas os polimorfismos previamente descritos.

A única alteração identificada nas pacientes, que poderia estar associada ao HC foi a -95G>T em homozigose. Em 2002, Umeki *et al.* descreveram na população japonesa a alteração -95G>T como polimorfismo. A análise de familiares não afetados mostrou que 66,67% (10/15) apresentavam a alteração em heterozigose. E nos 126 indivíduos controles avaliados neste estudo, tal alteração foi identificada principalmente em heterozigose (13,49 % - 17/126). A prevalência em homozigose foi baixa (1,42%).

A atividade da TPO no tecido tireodeano das pacientes mostrou-se diminuída em 70% na paciente II.7 e em 50% na amostra da paciente II.10 tendo como referência atividade em tecido controle normal. Esses resultados induziram a pensar que a TPO estava sendo expressa, porém com atividade reduzida ou que poderia haver baixa expressão protéica. Esta última hipótese se fortificou com o resultado dos experimentos que mostraram que a expressão do RNAm de *TPO* no tecido tireoideano das pacientes era aproximadamente 38% menor que em tecido controle normal.

Estudo anterior mostrou que quando polimorfismos são encontrados no promotor de alguns genes podem alterar sua atividade transcricional (Fischer *et al.*, 2007). Estima-se que aproximadamente 10% dos promotores possuam sequencias variantes funcionalmente relevantes (Hoogendoorn *et al.*, 2003).

A diminuição da atividade da proteína TPO e da expressão do seu RNAm nas amostras de tecido tireoideano das pacientes em estudo juntamente com os achados no rastreamento de alterações nos genes *TPO*, *DUOX2* e *DUOXA2* nos levaram propor o terceiro objetivo deste trabalho que foi avaliar o impacto da alteração -95G>T na expressão gênica de TPO através da ensaios com gene repórter (luciferase).

Para isso, foram construídos vetores de expressão contendo o gene da luciferase sob ação de fragmentos do promotor de *TPO* selvagem ou com a alteração -95G>T. Os primeiros resultados com utilização dos plasmídios contendo fragmento de 330 pb do promotor (sp-TPO-95G e sp-TPO-95T), na presença do indutor de AMPc - parascolina, não mostraram diferença de expressão, nem quando comparada ao controle negativo do ensaio (pGL3 *basic*).

Por este motivo, levantamos a possibilidade que o fragmento de DNA de promotor clonado na frente do gene da luciferase não tinha tamanho suficiente para modular a expressão do gene repórter. Porém, de acordo com Abramowicz *et al.*, (1992), o promotor mínimo ativo de *TPO* pode conter apenas 130pb (Figura 10) na presença de parascolina, que induz o aumento dos níveis de AMPc. O mesmo grupo mostrou também que o fragmento com

apenas 192pb de região promotora apresentava atividade de 59,9%, também na presença do indutor de AMPc, conforme demonstrado na figura 19.

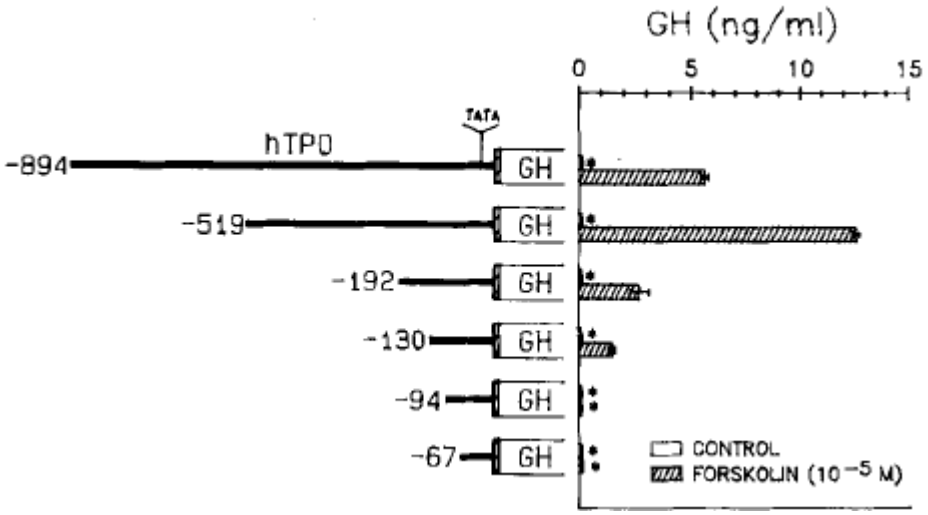


Figura 19: Expressão do gene repórter GH sob controle de fragmentos de diferentes tamanhos do promotor do gene *TPO* em células primarias de tireóide de cachorro. As barras do lado direito representam a atividade do promotor (Abramowics et al, 1992).

Embora a literatura sinalizasse que o fragmento do promotor de 330bp clonado seria funcional, iniciamos novo processo de clonagem para construção dos plasmídios xpTPO-95G e xpTPO-95T com região promotora de 1.260pb. Os ensaios para avaliação da atividade do gene repórter luciferase foram realizados também na presença do indutor de AMPc parascolina (Sigma). Nestes experimentos foi possível verificar que ambos promotores promoviam a expressão do gene repórter, contudo não se observou diferença entre as expressões dos plasmídios xpTPO-95G/xpTPO-95T (Figura 17). Por este motivo, levantamos então a hipótese de estar

usando célula hospedeira inadequada, a célula HEK293 (célula renal de embrião humano).

É sabido que o promotor de *TPO* é regulado pela ação do *TSH* e dos fatores de transcrição específicos da tireóide, como *NKX2.1*, *FOXE1* e *PAX8* (Congdon *et al.*, 2001). Estudos mostram que a expressão do gene *NKX2.1* ocorre somente em células tireoideanas e em células pulmonares e que o gene *PAX-8* é expresso na tireóide, durante o desenvolvimento cardíaco (Shi *et al.*, 2009) e hepático (Béland & Bouchard, 2006). Já o gene *FOXE-1* é expresso na célula tireoideana, em folículos capilares e durante a formação dos testículos (Sequeira *et al.*, 2003). Nenhum estudo aponta a expressão destes genes em tecido renal (Guazzi *et al.*, 1990).

Os insertos clonados nos plasmídios spTPO-95G e spTPO-95T possuem 330pb (sendo 230pb de região promotora e 100pb de início do exon 1 de *TPO*, não transcrito) e os plasmídios xpTPO-95G e xpTPO-95T, possuem 1260bp (sendo 1.160pb, de região promotora e 100pb de início do exon 1). Em todos os casos a região clonada contem os sítios de ligação do fator de transcrição NKX2.1, PAX8 e outros (Figura 20).

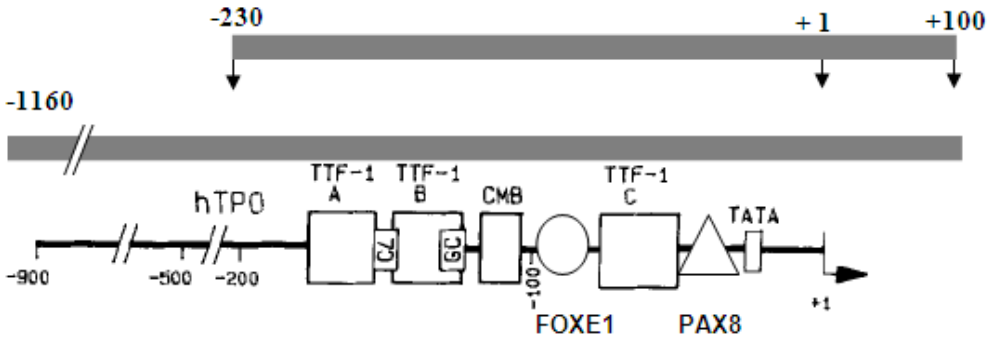


Figura 20: Promotor do gene da *TPO* mostrando os elementos regulatórios (CRE-like, motivo G+C, TATA box) e sítios de ligação dos fatores de transcrição

específicos da tireóide (Abramowicz *et al.*, 1992; Cuesta *et al.*, 2007 adaptado). Blocos cinza indicam os fragmentos do promotor clonado de 330 bp ou 1.260 bp.

Para poder compreender o real efeito da alteração -95G>T, realizamos estudo funcional com os plasmídios xpTPO-95G e xpTPO-95T (inserto de 1.260pb) sob ação dos fatores de transcrição PAX8 e NKX2.1, concomitantemente. Foi verificado que a expressão do gene repórter diminuía drasticamente com ativação do promotor portador do nucleotídio T na posição -95 quando comparada com a do promotor que possuía G nessa posição (p=0,0037). Estes resultados sugerem que o polimorfismo -95T pode ser funcional, capaz de diminuir a atividade do promotor de TPO, adquirindo função de silenciador gênico na presença de fatores de transcrição. Estudos anteriores mostraram que genes de Classe I do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) possuem elementos responsivos ao AMPc (CRE-like) entre as posições -129 e -90 do início da transcrição, que respondem como silenciadores gênicos (Saji *et al.*, 1997). O silenciador atuaria em resposta ao estímulo do TSH/AMPc na presença de proteínas especificas da tireóide como PAX8, entre outros.

Para complementar este estudo, foi analisada a expressão de outros genes específicos da tireóide (*TG*, *NIS*, *NKX2.1*, *PAX-8* PDS e r*TSH*) no tecido das pacientes. Foi possível verificar redução da expressão dos genes *PAX8* e *NKX2.1* e aumento da expressão dos genes *NIS*, r*TSH*, *TG* e *PDS* quando comparado com a expressão nos tecidos controles.

Estes resultados poderiam ser consequencia dos elevados valores de TSH sérico observados em ambas irmãs, que estimularia a síntese do

mRNA de *TG*, *rTSH* e *NIS* (Mascia *et al.*, 2002). Alem disso, foi visto que em células tireoideanas de rato a TG provoca diminuição da expressão dos fatores de transcrição NKX2.1, FOXE1 e PAX8 e induz fortemente a expressão de PDS [16,17]. Porém, outros estudos mostram resultados contraditórios sobre esse tema (Suzuki et al., 2000; Mascia et al, 2002; Suzuki et al., 2006), sugerindo a existência de uma rede de interações funcionais entre os fatores e cofatores de transcrição que controlam a expressão gênica da célula folicular tireoideana.

Ainda, em 2009, Di Palma *et al.* sugeriram que a expressão simultânea entre o PAX8 e NKX2.1 ocorre apenas em células tireoideanas causando interação funcional entre esses dois fatores de transcrição e que a ligação bioquímica e sinérgica entre eles poderia ativar a transcrição do promotor de *TPO* e *TG* (Kimura *et al.,* 1996; Miccadei *et al.*, 2002; Di Palma *et al.*, 2003). Sendo assim a baixa expressão de ambos os fatores de transcrição, PAX8 e NKX2.1, poderia também interferir na diminuição de expressão de mRNA TPO observada nos tecidos. Não pode ser descartada a possibilidade de que a baixa expressão do RNAm dos genes PAX8 e NKX2.1 possa estar sendo modulada por outros fatores de transcrição. Em 2000, o gene HEX (*haematopoietically expressed homeobox*) foi identificado em células tireoideanas atuando como repressor do promotor da TG e inibindo o efeito do PAX8 e NKX2.1 (Martinez *et al.*, 2000; Pellizzari *et al.*, 2000, Lacroix *et al.*, 2006).

A análise conjunta dos resultados deste estudo indica que o HC com DPII das pacientes deve ser resultado da diminuição da atividade da TPO e

sugere que a alteração -95G>T modula a atividade do promotor de TPO diminuindo sua expressão, Sendo assim, este polimorfismo poderia ser considerado funcional.

Entretanto estes resultados não permitem explicar a presença desta alteração na população sem doença tireóideana (1,42% -1/126). A presença de uma segunda mutação ou alteração em algum outro gene que participe da síntese hormonal, em evento anterior a ativação da TPO (por exemplo, outros fatores de transcrição), ou de um background genético específico em ambas irmãs em conjunto com a alteração -95G>T poderiam provocar a diminuição da atividade da TPO nas pacientes estudadas.

6. Conclusões

1. Não foi possível concluir o impacto da mutação Q660E na atividade da proteína;
2. O extensivo estudo molecular das amostras das pacientes portadoras de hipotireoidismo congênito com defeito parcial de incorporação de iodeto e bócio sinalizou que o quadro clínico deve ser resultado da diminuição da atividade da TPO. (ou esteja associada à diminuição da atividade);
3. A alteração -95G>T identificada no promotor da TPO das pacientes provoca diminuição da expressão gênica somente na presença de fatores de transcrição específicos da tireóide NKX2.1 e PAX8, em sistema *in vitro*. Sendo assim, essa alteração poderia levar à baixa síntese de RNA mensageiro de TPO no tecido tireoideano observada e consequentemente à diminuição da atividade protéica. Entretanto, mais estudos devem ser feitos para compreender a presença (em baixa frequência) dessa alteração na população normal e definir se o polimorfismo é funcional.
4. A presença da alteração -95G>T nos indivíduos sem alteração da função tireoideana sugere a presença de uma segunda mutação ou polimorfismo em genes da biosíntese dos hormônios tireoideanos que participem da modulação da expressão de TPO.

7. Referências Bibliográficas

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(4):1200-1204. a

Abramowicz MJ, Vassart G, Christophe D. Functional study of the human thyroid peroxidise gene promoter. Eur J Biochem. 1992; 203(3):467-473.b

Alper O, Turkkahraman D, Bircan I, Luleci G. Novel human pathological mutations. Gene symbol: TPO. Disease: Thyroid peroxidase deficiency. Hum Genet. 2010;127(1):120.

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

Avbelj M, Tahirovic H, Debeljak M, Kusekova M, Toromanovic A, Krzisnik C, Battelino T. High prevalence of thyroid peroxidase gene mutations in patients with thyroid dyshormonogenesis. Eur J Endocrinol. 2007; 156(5): 511-519.

Aza-Blanc P, Di Lauro R, Santisteban P. Identification of a cis-regulatory element and a thyroid-specific nuclear factor mediating the hormonal regulation of rat thyroid peroxidase promoter activity. Mol Endocrinol. 1993; 7(10):1297-1306.

Bakker B, Bikker H, Vulma T, de Randamie JSE, Wiedijk BM, de Vijlder JJM. Two decades of screening for congenital hypothyroidism in the Netherlands: TPO gene mutations in total iodine organification defects (an update). J Clin Endocrinol.Metab. 2000; 85(10):3708-3712.

Béland M, Bouchard M. PAX gene function during kidney tumorigenesis: a comparative approach. Bull Cancer. 2006; 93(9):875-882.

Bikker H, den Hartog MT, Vulsma T, Baas F, De Vijlder JM. A 20-base pair duplication in the human thyroid peroxidase gene results in a total iodide organification defect and congenital hypothyroidism. J Clin Endocrinol Metab. 1994; 79(1):248-252.

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

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): 649-653.

Bizhanova A & Kopp P. Genetics and phenomics of Pendred syndrome. Molecular and Cellular Endocrinology. 2010; 322 (1-2): 83–90.

Borck G, Roth C, Martiné U, Wildhardt G, Pohlenz J. Mutations in the PDS gene in German families with Pendred's syndrome: V138F is a founder mutation. J Clin Endocrinol Metab. 2003; 88(6):2916-2921.

Borck G, Topaloglu AK, Korsch E, Martine U, Wildhardt G, Onenli-Mungan N, Yuksel B, Aumann U, Koch G, Ozer G, Pfaffle R, Scherberg NH, Refetoff S, Pohlenz J. Four new cases of congenital secondary hypothyroidism due to a splice site mutation in the thyrotropin-beta gene: phenotypic variability and founder effect. J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89(8): 4136-4141.

Carranza D, Van Vliet G, Polak M. Congenital hypothyroidism. Ann Endocrinol (Paris). 2006; 67(4):295-302.

Castanet M, Marinovic D, Polak M, Léger J. Epidemiology of thyroid dysgenesis: the familial component. Horm Res Paediatr. 2010; 73(4):231-217.

Castanet M, Park SM, Smith A, Bost M, Léger J, Lyonnet S, Pelet A, Czeenichow P, Chatterjee K, Polak M. A novel loss-of-fuction mutation in TTF2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate. Hum Molec Gen. 2002; 11(17):2052-2059.

Cavalieri RR. Iodine metabolism and thyroid physiology: current concepts. Thyroid. 1997; 7(2):177-181. Review.

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

Congdon T, Nguyen LQ, Nogueira CR, Habiby RL, Medeiros-Neto G, Kopp P. A novel mutation (Q40P) in PAX8 associated with congenital hypothyroidism and thyroid hypoplasia: evidence for phenotypic variability in mother and child. J Clin Endocrinol Metab. 2001; 86(8):3962-3967.

Corbetta C, Weber G, Cortinovis F, Calebiro D, Passoni A, Vigone MC, Beck-Peccoz P, Chiumello G, Persani L. A 7-year experience with low blood TSH cutoff levels for neonatal screening reveals an unsuspected frequency of congenital hypothyroidism (CH). Clin Endocrinol (Oxf). 2009; 71(5):739-745.

Cuesta I, Zaret KS, Santisteban P. The forkhead factor FoxE1 binds to the thyroperoxidase promoter during thyroid cell differentiation and modifies compacted chromatin structure. Mol Cell Biol. 2007; 27(20):7302-7314.

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

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):1083-1105.

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, Vliet GV. Pseudodominant Inheritance of Goitrous Congenital Hypothyroidism Caused by TPO Mutations: Molecular and in Silico Studies. J Clin Endocrinol Metab. 2008, 93(2):627–633.

Delange F. Neonatal screening for congenital hypothyroidism: results and perspectives. Horm Res. 1997; 48 (2): 51-61.

Di Cosmo C, Liao XH, Dumitrescu AM, Philp NJ, Weiss RE, Refetoff S. Mice deficient in MCT8 reveal a mechanism regulating thyroid hormone secretion. J Clin Invest. 2010; 120 (9): 3377-3388.

Di Palma T, Nitsch R, Mascia A, Nitsch L, Di Lauro R, Zannini M. The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription. J Biol Chem. 2003; 278(5):3395-3402.

Di Palma T, D'Andrea B, Liguori GL, Liguoro A, de Cristofaro T, Del Prete D, Pappalardo A, Mascia A, Zannini M. TAZ is a coactivator for Pax8 and TTF-1, two transcription factors involved in thyroid differentiation. Exp Cell Res. 2009 Jan 15;315(2):162-175.

Dohan O, De la Vieja A, Carrasco N. Molecular study of the sodium-iodide symporter (NIS): a new field in thyroidology. Trends Endocrinol Metab. 2000; 11(3):99-105.

Dohán O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. Endocr Rev. 2003; 24(1):48-77. Review.

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

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):760-761.

Eskandari S, Loo DD, Dai G, Levy O, Wright EM, Carrasco N. Thyroid Na+/I-symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. J Biol Chem. 1997;272(43):27230-27238.

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), 411–422.

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 USA. 1999; 96(17):9727-9732.

Fagman H, Andersson L, Nilsson M. The developing mouse thyroid: embryonic vessel contacts and parenchymal growth pattern during specification, budding, migration, and lobulation. Dev Dyn. 2006; 235(2):444-455.

Fagman H, Nilsson M. Morphogenesis of the thyroid gland. Mol Cell Endocrinol. 2010; 323(1):35-54. Review.

Fayadat L, Fernandez SS, 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): 10533-10538.

Fayadat L, Fernandez SS, 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): 15948-15954.

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):3793-3800.

Ferreira ACF, Neto JC, da Silva ACM, Kuster RM, Carvalho DP. Inhibition of Thyroid Peroxidase by *Myrcia uniflora* Flavonoids. Chem Res Toxicol. *2006;* 19(3):351-355.

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

Fisher M, Wetherill LF, Carr LG, You M, Crabb DW. Association of the aldehyde dehydrogenase 2 promoter polymorphism with alcohol consumption and reactions in an American Jewish population. Alcohol Clin Exp Res. 2007; 31(10):1654-1659.

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.

Fuchs O, Pfarr N, Pohlenz J, Thanner F, Schmidt H. Congenital hypothyroidism caused by a novel homozygous mutation in the thyroid peroxidase gene. J Pediatr Endocrinol Metab. 2008; 21(11):1093-1097.

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):2110-2118.

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):1574-1576.

Grasberger H & Refetoff S. Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent. J Biol Chem. 2006; 281(27): 18269–18272

Gruters A. Congenital hypothyroidism. Pediatric Annals. 1992; 21(1): 15-21.

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):3631-3639.

Hinton R, Petvises S, O'Neill H. Myelopoiesis related to perinatal spleen. Immunol Cell Biol. [Epub ahead of print]

Hoogendoorn B, Coleman SL, Guy CA, Smith K, Bowen T, Buckland PR, O'Donovan MC. Functional analysis of human promoter polymorphisms. Hum Mol Genet. 2003; 12(18):2249-2254.

http://www.uniprot.org/uniprot/P07202.

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):6216-6224.

Kimura S, Kotani T, McBride DW, Umeki K, Hirai K, Nakayama T, Ohtaki S. Human thyroid peroxidase: complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping, and identification of alternately spliced mRNAs. Proc Nat Acad Sciences. 1987; 84(16): 5555-5559.

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):4481-4489.

Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, Gonzalez FJ. The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. Genes Dev. 1996; 10(1):60-69.

Kimura S. Role of the thyroid-specific enhancer-binding protein in transcription, development and differentiation. Eur J Endocrinol. 1997; 136(2):128-136.

Klett M. Epidemiology of Congenital Hypothyroidism. Exp Clin Endocrinol Diab. 1997; 4: 19-23. Review.

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

Kopp P. Pendred's syndrome and genetic defects in thyroid hormone synthesis. Rev Endocr Metab Disord. 2000; 1(1-2): 109-121.

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

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):267-273.

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 iodine organification defect. J Endrocrinol. 1999; 160(2):267-273.

Krude H, Biebermann H, Schnabel D, Ambrugger P, Gruters A. Molecular pathogenesis of neonatal hypothyroidism. Horm Res. 2000; 53 (1): 12-8.

Kuliawat R, Ramos-Castaneda J, Liu Y, Arvan P. Intracellular trafficking of thyroid peroxidase to the cell surface. J Biol Chem. 2005; 280(30):27713–27718.

La Franchi S. Thyroid function in the preterm infant. Thyroid. 1999; 9(1):71-78.

Lacroix L, Michiels S, Mian C, Arturi F, Caillou B, Filetti S, Schlumberger M, Bidart JM. HEX, PAX-8 and TTF-1 gene expression in human thyroid tissues: a

comparative analysis with other genes involved in iodide metabolism. Clin Endocrinol (Oxf). 2006; 64(4):398-404.

LaFranchi S. Congenital hypothyroidism: etiologies, diagnosis, and management. Thyroid. 1999; 9(7):735–740.

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): 4568-4577.

Lindsay RS & Toft AD. Hypothyroidism. The Lancet. 1997; 349(9049): 413-417.

Loeber JG. Neonatal screening in Europe; the situation in 2004. J Inherit Metab Dis. 2007; 30(4):430-438.

Macchia PE, De Felice M, Di Lauro R. Molecular genetics of congenital hypothyroidism. Curr Opin Genet Dev. 1999; 9(3):289-294.

Martinez Barbera JP, Clements M, Thomas P, Rodriguez T, Meloy D, Kioussis D, Beddington RS. The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. Development. 2000; 127(11):2433-2445.

Maruo Y, Takahashi H, Soeda I, 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 gene in Japanese patients detected by a neonatal screening program. J Clin Endocrinol Metab. 2008;93(11):4261-4267.

Mascia A, Nitsch L, Di Lauro R, Zannini M. Hormonal control of the transcription factor Pax8 and its role in the regulation of thyroglobulin gene expression in thyroid cells. J Endocrinol. 2002; 172(1):163-176.

Mauchamp J, Mirrione A, Alquier C, André F. Follicle-like structure and polarized monolayer: role of the extracellular matrix on thyroid cell organization in primary culture. Biol Cell. 1998; 90(5): 369-380.

Medeiros-Neto G, Targovnik HM, Vassart G. Defective thyroglobulin synthesis and secretion causing goiter and hypothyroidism. Endocr Rev. 1993; 14(2): 165–183. a

Medeiros-Neto G. In: Hipotireoidismo congênito no Brasil. Como era, como estamos, para onde vamos. Sambureau São Paulo, Brasil, 2003.

Medeiros-Neto GA, Billerbeck AE, Wajchenberg BL, Targovnik HM. Defective organification of iodide causing hereditary goitrous hypothyroidism. Thyroid. 1993; 3(2):143-159. b

Miccadei S, De Leo R, Zammarchi E, Natali PG, Civitareale D. The synergistic activity of thyroid transcription factor 1 and Pax 8 relies on the promoter/enhancer interplay. Mol Endocrinol. 2002; 16(4):837–846

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

Moreno JC & Visser TJ. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to iodotyrosine deiodinase (DEHAL1) gene mutations. Molecular and Cellular Endocrinology. 2010; 322(1-2):91-98. Review.

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, Klootwijk 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):1811–1818.

Moura EG, Rosenthal D, Carvalho-Guimarães DP. Thyroid peroxidase activity in human nodular goiters. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 1989; 22(1):31-39.

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):1155-1159.

Nakashima T & Taurog A. Improved assay procedures for thyroid peroxidase; applications to normal and adenomatous human thyroid tissue. Clin Chim Acta. 1978; 83(1-2):129-140.

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):1145-1151.

Neves SC. Hipotireoidismo congênito: rastreamento e identificação de mutações no gene TPO em pacientes com defeito parcial ou total de incorporação de iodeto. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.

Niu DM, Hwang B, Chu YK, Liao CJ, Wang PL, Lin CY. High prevalence of a novel mutation (2268insT) of the thyroid peroxidase gene in Taiwanese patients with total iodide organification defect, evidence for a founder effect. J Clin Endocrinol Metab. 2002; 87(9): 4208-4212.

Nunes J & Pommier J. Formation of thyroid hormones. Vitam. Horm. 1982; 39:175-229.

Ohye H & Sugawara M. Dual oxidase, hydrogen peroxide and thyroid diseases. Experimental Biology and Medicine 2010; 235(4): 424–433.

Olivieri A, Medda E, De Angelis S, Valensise H, De Felice M, Fazzini C, Cascino I, Cordeddu V, Sorcini M, Stazi MA; Study Group for Congenital Hypothyroidism. High risk of congenital hypothyroidism in multiple pregnancies. J Clin Endocrinol Metab. 2007; 92(8):3141-3147.

Ozbek MN, Uslu AB, Onenli-Mungan N, Yuksel B, Pohlenz J, Topaloglu AK. Thyroid peroxidase gene mutations causing congenital hypothyroidism in three Turkish families. J Pediatr Endocrinol Metab. 2009; 22(11):1033-1039

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): 1061-1071.

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):783-786.

Park SM & Chatterjee VVK. Genetics of congenital hypothyroidism. J Med Genet. 2005; 42(5): 379–389.

Pellizzari L, D'Elia A, Rustighi A, Manfioletti G, Tell G, Damante G. Expression and function of the homeodomain-containing protein Hex in thyroid cells. Nucleic Acids Res. 2000; 28(13): 2503-2511.

Perry R, Heinrichs C, Bourdoux P, Khoury K, Szöts F, Dussault JH, Vassart G, Van Vliet G Discordance of monozygotic twins for thyroid dysgenesis: implications for screening and for molecular pathophysiology. J Clin Endocrinol Metab. 2002; 87(9):4072-4077.

Pfarr N, Borck G, Turk A, Napiontek U, Keilmann A, Muller-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): 2678-2681.

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):810-815.

Pohlenz J, Medeiros-Neto G, Gross JL, Silveiro SP, Knobel M, Refetoff S. Hypothyroidism in a Brazilian kindred due to iodide trapping defect caused by a

homozygous mutation in the sodium/iodide symporter gene. Biochem Biophys Res Commun. 1997; 240(2):488–491.

Porterfield SP & Hendrich CE. The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development-current perspectives. Endocr Rev. 1993; 14(1): 94-106. Review

Riedel C, Dohán O, De la Vieja A, Ginter CS, Carrasco N. Journey of the iodide transporter NIS: from its molecular identification to its clinical role in cancer. Trends Biochem Sci. 2001;26(8):490-496. Review

Ris-Stalpers C, Bikker H. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to TPO mutations. Mol Cell Endocrinol. 2010;322(1-2):38-43. Review

Rivolta CM, Esperante SA, Gruñeiro-Papendiek, 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. Mutation in Brief. 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): 238-246.

Rodrigues C, Jorge P, Soares JP, Santos I, Salomao R, Madeira M, Osorio 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):193-198.

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):3500-3503.

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

Rubio IGS & Medeiros-Neto G. Mutations of the thyroglobulin gene and its relevance to thyroid disorders. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2009; 16(5):373–378.

Ruf J & Carayon P. Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. Arch Biochem Biophys. 2006; 445(2):269-277.

Saji M, Shong M, Napolitano G, Palmer LA, Taniguchi SI, Ohmori M, Ohta M, Suzuki K, Kirshner SL, Giuliani C, Singer DS, Kohn LD. Regulation of major histocompatibility complex class I gene expression in thyroid cells. Role of the cAMP response element-like sequence. J Biol Chem. 1997; 272(32):20096-20107.

Santos CL, Bikker H, Rego KJ, Nascimento AC, Tambascia M, De Vijlder JJM. A novel mutation in TPO gene in goitrous hypothyroid patients with iodide organification defect. Clin Endocrinol. 1999; 51(2):165-172.

Sequeira MJ, Morgan JM, Fuhrer D, Wheeler MH, Jasani B, Ludgate M. Thyroid transcription factor-2 gene expression in benign and malignant thyroid lesions. Thyroid. 2001; 11(11):995-1001.

Shi XX, Lai DD, Zhang JY, Chu MP, Wang SB, Ni QM, Huang XY, Zhang HQ, Yang DY. Experimental analysis of microRNAs related to cardiac development differential expression. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2009; 89(20):1416-1420.

Simm D, Pfarr N, Pohlenz J, Prawitt D, Dörr HG. Two novel mutations in the human thyroid peroxidase (TPO) gene: genetics and clinical findings in four children. Acta Paediatr. 2009; 98(6):1057-1061.

Spitzweg C, Morris JC. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to NIS mutations. Mol Cell Endocrinol. 2010 Jun 30;322(1-2):56-63. Review.

Suzuki K, Kobayashi Y, Katoh R, Kohn LD, Kawaoi A. Identification of thyroid transcription factor-1 in C cells and parathyroid cells. Endocrinology. 1998; 139(6):3014–3017.

Suzuki K, Nakazato M, Ulianich L, Mori-Aoki A, Moriyama E, Chung HK, Pietrarelli M, Grassadonia A, Matoba H, Kohn LD: Thyroglobulin autoregulation of thyroid-specific gene expression and follicular function. Rev Endocr Metab Disord 2000;1:217-224.

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

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):70-76.

Tajima T, Tsubaki J, Fujieda K. Two novel mutations in the thyroid peroxidase gene with goitrous hypothyroidism. Endocr J. 2005; 52(5):643-645.

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):288-296.

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.

Tenenbaum-Rakover Y, Mamanasiri 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.

Tonacchera M, Agretti P, Pinchera A, Rosellini V, Perri A, Collecchi P, Vitti P, Chiovato L. Congenital hypothyroidism with impaired thyroid response to thyrotropin (TSH) and absent circulating thyroglobulin: evidence for a new inactivating mutation of the TSH receptor gene. J Clin Endocrinol Metab. 2000; 85(3):1001-1008.

Tonacchera M, De Marco G, Agretti P, Montanelli L, Di Cosmo C, Freitas Ferreira AC, Dimida A, Ferrarini E, Ramos HE, Ceccarelli C, Brozzi F, Pinchera A, Vitti P. Identification and functional studies of two new dual-oxidase 2 (DUOX2) mutations in a child with congenital hypothyroidism and a eutopic normal-size thyroid gland. J Clin Endocrinol Metab. 2009; 94(11):4309-4314.

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.

Trueba SS, Augé J, Mattei G, Etchevers H, Martinovic J, Czernichow P, Vekemans M, Polak M, Attié-Bitach T. PAX8, TITF1, and FOXE1 gene expression patterns during human development: new insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations. J Clin Endocrinol Metab. 2005; 90(1):455-462.

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. Two novel missense mutations in thyroid peroxidase gene, R665W and G771R, result in localization defect and cause congenital hypothyroidism. Eur J Endocrinol. 2002; 146(4): 491-498.

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

van den Hove MF, Croizet-Berger K, Jouret F, Guggino SE, Guggino WB, Devuyst O, Courtoy PJ. The loss of the chloride channel, ClC-5, delays apical iodide efflux and induces a euthyroid goiter in the mouse thyroid gland. Endocrinology. 2006; 147(3):1287-1296.

Van Herle AJ, Vassart G, Dumont JE. Control of thyroglobulin synthesis and secretion. N Engl J Med. 1979; 301(5): 293-241 and 307-314.

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):182-191.

Whitley JR, Meikle AW, Watts NW. Thyroid function, In: Fundamentals of clinical chemistry, edn 4, ch 34, pp 6l7-628. CA Burtis & ER Ashwood (editors). Philadelphia, W. B. Sauders Co., 1996.

Wolff J & Chaikoff IL. Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. J Biol Chem. 1944; 174(2): 555-564.

Wu JY, Shu SG, Yang CF, Yang CF, Lee CC, Tsai FJ, 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): 627-635.

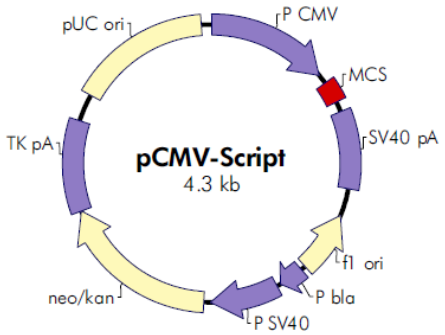
Zamproni I, Grasberger H, Cortinovis F, Vigone MC, Chiumello G, Mora S, Onigata K, Fugazzola L, Refetoff S, Persani L, Weber G. Biallelic inactivation of the dual oxidase maturation factor 2 (DUOXA2) gene as a novel cause of congenital hypothyroidism. J Clin Endocrinol Metab. 2008; 93(2):605-610.

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):735-741.

8. Apêndices

8.1 – Vetor pCMV-scipt

CMV promoter 1–602
multiple cloning site 651–758
SV40 polyA 811–1194
f1 origin 1332–1638
***bla* promoter** 1663–1787
SV40 promoter 1807–2145
neomycin/kanamycin resistance ORF 2180–2971
HSV-TK polyA 2972–3421
pUC origin 3559–4226



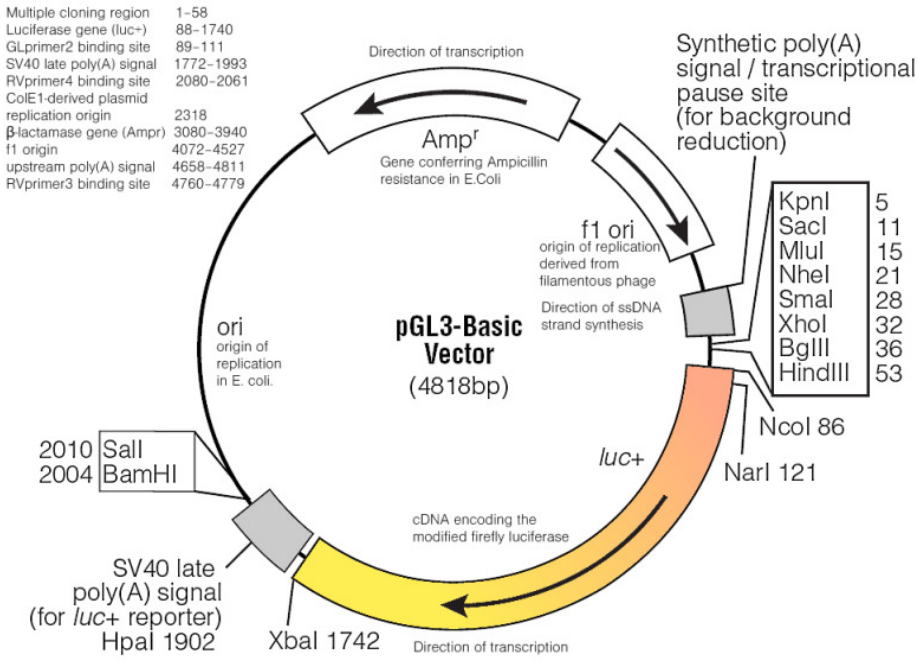
pCMV-Script Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 620–799)

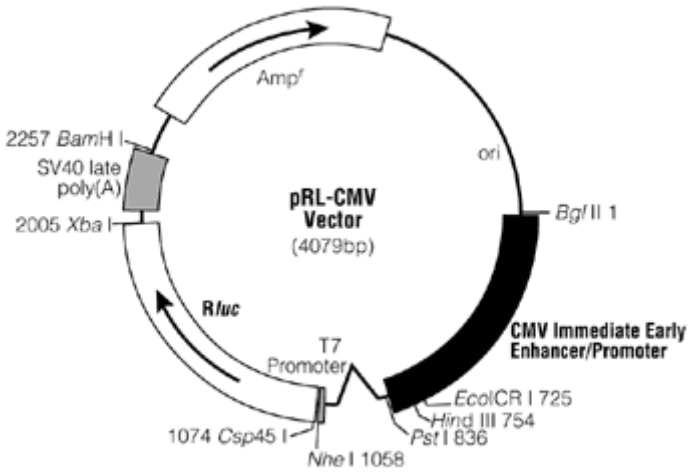
```
                                                  Sac I   BstX I Sac II      Not I
          T3 promoter                             |       |     |           |
AATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTA...

    Srf I       BamH I          Pst I     EcoR I    EcoR V   Hind III              Acc I/Sal I
    |           |               |         |         |        |                      |
...GCCCGGGCGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGAC...

    Xho I       Apa I     Kpn I
    |           |         |                                          T7 promoter
...CTCGAGGGGGGGCCCGGTACCAGGTAAGTGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTAC
```

8.2 – vetor pGL3-*basic*




Amp^r
2257 BamH I
SV40 late
poly(A)
2005 Xba I
ori
pRL-CMV
Vector
(4079bp)
Bgl II 1
Rluc
T7
Promoter
CMV Immediate Early
Enhancer/Promoter
EcoICR I 725
Hind III 754
Pst I 836
1074 Csp45 I
Nhe I 1058