Ester Saraiva Brust

Análise molecular de pacientes com hipotireoidismo congênito por defeito na
organificação do iodeto

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Suemi Marui

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Brust, Ester Saraiva

Análise molecular de pacientes com hipotireoidismo congênito por defeito na
organificação do iodeto / Ester Saraiva Brust. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Suemi Marui.

Descritores: 1.Recém-nascido 2.Criança 3.Hipotireoidismo congênito
4.Peroxidase da tireoide 5.NADPH oxidase 6.Mutação

USP/FM/DBD-338/14

Dedico este trabalho aos meus pais

Silas & Maria José

Il semble impossible pour ceux qui ne tentent rien

(Tudo parece impossível para quem nunca tenta nada)

Jean-Louis Etienne, médico e explorador francês

**Agradeço a Deus por ter me capacitado a estudar e desenvolver este projeto.
Agradeço pelo grande amor, as misericórdias e a graça em minha vida. Agradeço
pela salvação em Cristo Jesus!**

***“Porque dEle, e por meio dEle, e para Ele são TODAS as coisas. A Ele, pois, a glória
eternamente. Amém!”***

Romanos 11.36

Quero agradecer a todos os envolvidos neste trabalho: à minha orientadora Dra. Suemi Marui, pela oportunidade de estudo, pesquisa e aprendizado, e por ter confiado no meu trabalho; à Dra Cristine Barbosa Beltrão, pela colaboração, ajuda e apoio; à Dra Ileana Rubió, professora UNIFESP, e seu aluno Marlon Messias da Conceição Silva, pessoas essenciais durante o estudo funcional; à FAPESP, pelo apoio financeiro.

Aos funcionários e alunos do LIM-25, pela colaboração e ajuda em diversas etapas do projeto; agradeço em especial aos amigos Thiago Patente, Daniele Santos, Maria Beatriz Monteiro, Amanda Shinzato, Paulo Vinicius Amorim e Andrea Gomes.

Agradeço às amigas que já não fazem mais parte do LIM-25, Dra Viviane Blóis, Dra Ana Luiza Galvão, Dra Erika Urbano de Lima, Paola Rossi Mezzalira, pelos bons momentos e ajuda incondicional.

Agradeço à minha família: aos meus pais Silas & Maria José, pela educação, caráter e ensinamentos transmitidos; aos meus avós presentes José & Marly, e não mais presentes João Pedro & Manoela, pelo amor e cuidado; aos meus irmãos Tiago & Natália, pelo companheirismo, e Saulo & Lia, também pelo companheirismo e especialmente por me acolherem em seu lar durante a realização deste projeto.

Agradeço à família IPJT, que desde o meu nascimento são uma pequena parte da minha família eterna: aos homens e mulheres, jovens e idosos, aos ainda presentes e aos que só encontrarei na Glória. Aos pastores que ali me conduziram, aos professores que me ensinaram e às minhas crianças que tanto amo.

Agradeço aos amigos do passado e do presente, que de alguma forma me influenciaram e também fazem parte desta conquista.

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular – Unidade de Tireoide (LIM-25), Divisão de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Apoio: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processos 2011/02627-5 e 2012/00324-8.

Sumário

Lista de abreviaturas.....	x
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xiii
Resumo	xiv
Abstract.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Tireoide.....	1
1.1.1 Síntese dos hormônios tireoidianos	1
1.2 Hipotireoidismo congênito	4
1.3 Tireoperoxidase	7
1.4 Geração de peróxido de hidrogênio.....	10
1.4.1 DUOX2.....	12
1.4.2 DUOXA2.....	14
1.5 Estudos anteriores e seleção dos pacientes.....	15
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	19
3.1 Pacientes	19
3.2 Análise molecular dos genes <i>DUOX2</i> e <i>DUOXA2</i>	19
3.2.1 <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR).....	19
3.2.2 Sequenciamento.....	20
3.3 Análise funcional TPO p.R584Q.....	21
3.3.1 Mutagênese sítio-dirigida	21
3.3.2 Cultura de células	22
3.3.3 Transfecção.....	23

3.3.4	Quantificação relativa de TPO	24
3.3.5	Ensaio da atividade oxidativa	25
3.4	Análise <i>in silico</i>	26
4	RESULTADOS	28
4.1	Estudo molecular	28
4.1.2	Alterações genéticas no gene <i>DUOX2</i>	28
4.1.2	Alterações genéticas no gene <i>DUOXA2</i>	36
4.2	Estudo funcional da mutação p.R584Q da TPO	37
5	DISCUSSÃO	42
5.1	Avaliação molecular dos genes <i>DUOX2</i> e <i>DUOXA2</i>	42
5.2	Avaliação funcional da alteração TPO p.R584Q	44
5.3	Análise clínica, laboratorial e molecular dos pacientes	46
6	CONCLUSÃO	50
7	ANEXOS	51
7.1	Anexo A	51
7.2	Anexo B	54
7.3	Anexo C	55
7.4	Anexo D	57
7.5	Anexo E	61
8	REFERÊNCIAS	63

Lista de abreviaturas

CF	Células foliculares
DEHAL1	Desalogenase 1
DIT	Diiodotirosina
DOI	Defeito na organificação do iodeto
DT	Disgenesia tireoidiana
DUOX2	<i>Dual oxidase 2</i>
DUOXA2	<i>Dual oxidase maturation factor 2</i>
EYA1	<i>Eyes absent homolog 1</i>
FOXE1	<i>Forkhead box E1</i>
HC	Hipotireoidismo congênito
HHEX	<i>Hematopoietically expressed homeobox</i>
HOXA3	<i>Homeobox A3</i>
HT	Hormônio tireoidiano
MIT	Monoiodotirosina
NIS	Simportador sódio / iodo
NKX2.1	<i>NK2 homeobox 1</i>
PAX8	<i>Paired box 8</i>
<i>SLC26A4</i>	Pendrina
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TG	Tireoglobulina
TPO	Tireoperoxidase
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
TSHR	Receptor do hormônio estimulante da tireoide

Lista de figuras

Figura 1: Representação esquemática da célula folicular tireoidiana mostrando as diferentes etapas da hormonogênese e as proteínas e enzimas envolvidas	2
Figura 2: Estrutura molecular dos hormônios tireoidianos T3 e T4	3
Figura 3: Esquema representativo das 8 variantes da TPO indicando as perdas ao longo de cada isoforma	8
Figura 4: Representação esquemática da TPO mostrando as divisões estruturais e principais domínios da proteína de acordo com a sequência de cada exon	9
Figura 5: Arranjo dos genes <i>DUOX1</i> e <i>DUOX2</i> e seus fatores de maturação <i>DUOXA1</i> e <i>DUOXA2</i> no cromossomo 15	11
Figura 6: Representação esquemática do funcionamento DUOX2/DUOXA2 e TPO	12
Figura 7: Representação esquemática da DUOX2 mostrando as divisões estruturais e principais domínios da proteína	13
Figura 8: Representação esquemática da DUOXA2 mostrando as divisões estruturais da proteína	15
Figura 9: Diversidade da população controle norte americana avaliada para a alteração p.R584Q (rs145499396)	17
Figura 10: Representação esquemática do plasmídio pTPOwt	22
Figura 11: Cromatograma de parte do gene <i>DUOX2</i> (exon 25) onde foi identificada a troca c.3260C>T (p.A1087V)	29
Figura 12: Representação esquemática da DUOX2 mostrando a posição da alteração p.A1087V na terceira porção transmembrana da proteína	29
Figura 13: Análise da alteração p.A1087V no gene <i>DUOX2</i> gerada pelo programa de bioanálise <i>PolyPhen2</i>	30
Figura 14: Análise da alteração p.A1087V no gene <i>DUOX2</i> gerada pelo programa de bioanálise <i>PSIPRED</i>	32
Figura 15: Propriedades funcionais do polimorfismo p.H678R	33
Figura 16: Análise do polimorfismo p.H678R no gene <i>DUOX2</i> gerada pelo programa de bioanálise <i>PolyPhen2</i>	34
Figura 17: Análise da alteração p.H678R no gene <i>DUOX2</i> gerada pelo programa de bioanálise <i>PSIPRED</i>	36

Figura 18: Curva de quantificação utilizada para calcular o número de cópias virais presentes nas células transfectadas (escala linear)	37
Figura 19: Quantificação das amostras pTPOwt e pTPO584 mostrando as diferenças de CT entre as amostras nas diversas diluições (escala linear)	38
Figura 20: Ensaio da atividade oxidativa da TPO, mostrando a atividade extracelular da proteína de acordo com a intensidade da fluorescência gerada durante o ensaio.....	38
Figura 21: Análise da alteração p.R584Q no gene <i>TPO</i> gerada pelo programa de bioanálise <i>PolyPhen-2</i>	39
Figura 22: Análise da alteração p.R584Q no gene <i>TPO</i> gerada pelo programa de bioanálise <i>PSIPRED</i>	41

Lista de tabelas

Tabela 1: Estudos retrospectivos publicados entre 2010 e 2014 mostrando a prevalência do HC em diversos países.....	5
Tabela 2: Polimorfismos identificados no gene <i>DUOX2</i> nos pacientes estudados	28
Tabela 3: Análise da alteração p.A1087V no gene <i>DUOX2</i> gerada pelo programa de bioanálise <i>MutationTaster</i>	31
Tabela 4: Análise da alteração p.A1087V no gene <i>DUOX2</i> gerada pelo programa de bioanálise <i>SIFT</i>	32
Tabela 5: Análise do polimorfismo p.H678R no gene <i>DUOX2</i> gerada pelo programa de bioanálise <i>SIFT</i>	34
Tabela 6: Análise do polimorfismo p.H678R no gene <i>DUOX2</i> gerada pelo programa de bioanálise <i>MutationTaster</i>	35
Tabela 7: Polimorfismos identificados no gene <i>DUOXA2</i> nos pacientes estudados	36
Tabela 8: Análise da alteração p.R584Q no gene <i>TPO</i> gerada pelo programa de bioanálise <i>SIFT</i>	39
Tabela 9: Análise da alteração p.R584Q no gene <i>TPO</i> gerada pelo programa de bioanálise <i>MutationTaster</i>	40
Tabela 10: Mutações descritas nos genes <i>TPO</i> , <i>DUOX2</i> e <i>DUOXA2</i> segundo <i>The Humam Gene Mutation Database - Public</i>	51
Tabela 11: Dados clínicos, laboratoriais e moleculares dos pacientes com DOI estudados	54
Tabela 12: Sequência dos <i>primers</i> utilizados para as reações de amplificação, sequenciamento, mutagênese e quantificação neste trabalho	55

Resumo

A principal função da glândula tireoide é a produção dos hormônios T3 e T4, que promovem a regulação do consumo energético no organismo. O hipotireoidismo congênito (HC) é um distúrbio metabólico sistêmico, onde a produção de T3 e T4 no período neonatal é insuficiente. O HC por disormonogênese é uma doença causada por erros inatos na síntese de T3 e T4, com herança autossômica recessiva. Já foram descritas mutações nos genes *NIS*, *SLC26A4*, *DUOX2*, *DUOXA2*, *TPO*, *TG* e *DEHAL-1*. O defeito na organificação do iodeto (DOI) é o mais comum na disormonogênese, sendo a falha mais frequente na TPO, seguida pelas proteínas DUOX2 e DUOXA2. A TPO é responsável pela oxidação do iodeto, pela iodação da tireoglobulina e pelo acoplamento das tirosinas iodinizadas. Já foram descritas 70 mutações ao longo de todo o gene *TPO*. Por ser uma heme peroxidase, a TPO requer H₂O₂ para sua função. O principal núcleo catalítico gerador de H₂O₂ na tireoide é o complexo DUOX2/DUOXA2. Foram descritas 25 mutações no gene *DUOX2* e uma única mutação no gene *DUOXA2*. Em estudo anterior, avaliamos pacientes com HC após os 3 anos de idade para estabelecimento do diagnóstico etiológico, através de dosagem de TG sérica, ultrassonografia, captação e mapeamento da tireoide com ¹³¹I. Sete pacientes apresentaram DOI. Nestes pacientes avaliamos o gene *TPO* e identificamos diversos SNPs já descritos na literatura. Um paciente apresentou a mutação p.Q660E em heterozigose, outro paciente o SNP p.R584Q em homozigose, e um terceiro paciente as alterações p.Q660E e p.584Q em heterozigose composta. Os objetivos deste estudo foram pesquisar mutações dos genes *DUOX2* e *DUOXA2* nos pacientes com DOI e realizar o estudo funcional da alteração p.R584Q na TPO. Para o estudo molecular, extraímos o DNA de leucócitos periféricos dos pacientes e seus familiares, seguido de amplificação por PCR, e sequenciamento automático, e os resultados comparados com as sequências normais de cada gene (*GenBank*). Na análise funcional da alteração p.R584Q na TPO, células HeLa foram transfectadas com plasmídios pcDNA contendo o gene da TPO normal e alterado, e a atividade das proteínas produzidas pelas células foi avaliada pelo sistema AmplexRed. Análises *in silico* foram realizadas com os programas de bioanálise *PolyPhen*, *MutationTaster*, *SIFT* e *PSIPRED*. Ao final do estudo molecular, no gene *DUOX2*, identificamos 20 SNPs previamente descritos, incluindo o SNP funcional p.H678R (rs57659670), presente em heterozigose em 3 pacientes. Também identificamos a nova substituição p.A1087V em heterozigose em um paciente. De acordo com dados dos programas de bioanálise, a alteração p.A1087V é prejudicial e o SNP p.H678R é tolerável. No gene *DUOXA2* identificamos 5 polimorfismos previamente descritos e nenhuma mutação. No estudo funcional, verificamos uma diminuição significativa da atividade da TPO portadora da alteração p.R584Q em comparação à proteína normal (5% de atividade residual; p=0,0193). De acordo com os dados dos programas de bioanálise, a alteração p.R584Q é prejudicial. Três pacientes não apresentaram alterações nas regiões estudadas dos genes *TPO*, *DUOX2* e *DUOXA2*. As revisões dos dados clínicos e laboratoriais sugerem a presença de outras proteínas alteradas, como TG, Pendrina ou receptor do TSH. Um paciente apresentou a nova alteração p.A1087V na DUOX2 em heterozigose e nenhuma outra alteração nas regiões estudadas dos genes avaliados. Cogitamos a presença de alterações em regiões não avaliadas ou ainda a expressão monoalélica de DUOX2. O SNP funcional p.H678R na DUOX2 foi identificado em três pacientes com alterações na TPO: um com a alteração p.R584Q em homozigose, outro com a p.R584Q e a mutação

p.Q660E em heterozigose composta. Estes dois pacientes apresentam os dois alelos da TPO alterados, justificando o DOI. O terceiro caso apresentou apenas a mutação p.Q660E em heterozigose, podendo apresentar alterações em regiões não avaliadas ou ainda a expressão monoalélica da TPO. Concluimos que definimos o diagnóstico molecular de 4 dos nossos pacientes, que apresentaram importantes alterações nos genes avaliados, e ressaltamos que a alteração p.R584Q na TPO provoca perda da atividade, causando DOI.

Descritores: Recém-nascido, criança, hipotireoidismo congênito, peroxidase da tireoide, NADPH oxidase, mutação.

Abstract

The main role of the thyroid gland is to produce T3 and T4, which promote the regulation of body energy intake. Congenital hypothyroidism (CH) is a systemic metabolic disorder where T3 and T4 production during neonatal period is insufficient. CH due to dyshormonogenesis is a disease caused by inborn errors in T3 and T4 synthesis, with autosomal recessive inheritance. Mutations in *NIS*, *SLC26A4*, *DUOX2*, *DUOXA2*, *TPO*, *TG* and *DEHAL-1* genes have been described. The iodide organification defect (IOD) is the most common cause of dyshormonogenesis, being the TPO defect the most frequent, followed by defects in DUOX2 and DUOXA2 proteins. TPO is responsible for iodide oxidation, tyrosine iodination and its coupling. Seventy mutations have been described throughout the gene. As a heme peroxidase, TPO requires H₂O₂ to its regular function. The main catalytic core for H₂O₂ generation in thyroid is the DUOX2/DUOXA2 complex. Twenty five mutations have been described in *DUOX2* gene and only one mutation in *DUOXA2* gene. In our previous study, we evaluated patients with CH after 3 years of age to establish their etiologic diagnosis, by combining serum TG, thyroid ultrasound, and radioiodide uptake with ¹³¹I. Seven patients were diagnosed with IOD. In these patients, we evaluated *TPO* gene and identified several already described SNPs. One patient had the p.Q660E mutation in heterozygous state, another patient had the SNP p.R584Q in homozygous state and a third one had p.Q660E and p.584Q in compound heterozygous state. The aims of this study were to search for mutations in *DUOX2* and *DUOXA2* genes in patients with IOD and perform a functional study of TPO p.R584Q change. For the molecular study, DNA was extracted from peripheral blood leukocytes of each patient and parents, followed by PCR, and automatic sequence, and the results were compared with normal sequences of each gene (*GenBank*). For functional analysis of TPO p.R584Q, HeLa cells were transfected with pcDNA plasmids containing normal and altered *TPO* gene and the protein activity was assessed by AmplexRed system. *In silico* analyzes were performed with the bioanalysis programs: PolyPhen, MutationTaster, SIFT and PSIPRED. At the end of the molecular study, in *DUOX2* gene we identified 20 previously described SNPs, including the functional p.H678R SNP (rs57659670), present in heterozygous state in 3 patients. We also identified the new p.A1087V change in heterozygous state in one patient. According to bioassay programs datas, p.A1087V change is damage and p.H678R SNP is tolerable. In *DUOXA2* gene we identified five previously described polymorphisms and no mutation. In TPO functional study, we observed a significant activity decrease of TPO p.R584Q compared to normal TPO (5% of activity; p=0.0193). According to bioassay programs datas, p.R584Q is damaging. Three patients showed no changes in *TPO*, *DUOX2* and *DUOXA2* genes studied regions. A review of clinical and laboratory data suggested the presence of other altered proteins, such as TG, Pendrin or TSH receptor. One patient had the new DUOX2 p.A1087V alteration in heterozygous state and no other changes in the studied regions of evaluated genes, suggesting that there could be changes in other nonevaluated regions or the monoallelic expression of DUOX2. The functional DUOX2 p.H678R SNP was identified in three patients with changes in TPO: one with p.R584Q change in homozygous state and another one with p.R584Q and p.Q660E in compound heterozygous state. These cases have the two alleles of TPO changed, justifying their IOD. A third case showed only the TPO p.Q660E mutation in heterozygous state. We speculate that the patient may present changes in regions nonevaluated or the monoallelic expression of TPO. We conclude

that we defined the molecular diagnosis of four patients, that showed significant changes in evaluated genes, and that TPO p.R584Q change is functionally harmful, causing IOD.

Descriptors: Newborn, child, congenital hypothyroidism, thyroid peroxidase, NADPH oxidase, mutation.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tireoide

A principal função da glândula tireoide é a produção dos hormônios triiodotironina (T3) e tetraiodotironina ou tiroxina (T4). Estes hormônios promovem a regulação do consumo energético no organismo, sendo indispensáveis para o crescimento, o desenvolvimento e a maturação de vários órgãos (1).

Nos mamíferos, a glândula está localizada na região anterior do pescoço e possui dois tipos celulares distintos que produzem hormônios e calcitonina: células foliculares (CF) e células parafoliculares ou células C, respectivamente. As CF são as mais numerosas e agrupam-se em estruturas esféricas de única camada celular chamada foliculos, onde são produzidos e armazenados os hormônios tireoidianos (HT). As células C ficam dispostas entre os foliculos em posição parafolicular. A glândula tireoide é a primeira estrutura endócrina que se desenvolve no embrião humano. Com origens embrionárias distintas, as células C compreendem 1% do tecido tireoidiano e derivam do neuroectoderma, já as CF derivam do endoderma (2).

1.1.1 Síntese dos hormônios tireoidianos

O iodo é o elemento essencial para a síntese dos HTs, proveniente da dieta e absorvido na forma de iodeto. O hormônio estimulante da tireoide (TSH) liga-se em seu receptor de membrana acoplado à proteína G, o que promove a transcrição dos genes envolvidos na hormonogênese tireoidiana. O iodeto é então transportado ativamente da corrente sanguínea para o tireócito por meio do simportador sódio/iodo NIS que atua em

aos resíduos tirosil da TG. O acoplamento de dois MITs origina T4 e de um MIT com um DIT origina T3 (Figura 2). O complexo TG-hormônio formado entra na célula por invaginação e sofre proteólise dentro dos lisossomos e os HTs são finalmente liberados na corrente sanguínea. As moléculas de MIT e DIT não ligadas sofrem ação da enzima desalogenase 1 (DEHAL1) e o iodo é reaproveitado pela célula (1).

Figura 2: Estrutura molecular dos hormônios tireoidianos T3 e T4

A produção dos HTs é proporcional à quantidade de iodo disponível. Porém, o excesso de iodo pode exercer o chamado efeito Wolff-Chaikoff, quando os mecanismos de iodação são bloqueados pela diminuição da produção de H₂O₂, causada pela presença de quantidades excessivas de iodo (4).

1.2 Hipotireoidismo congênito

O hipotireoidismo congênito (HC) é um distúrbio metabólico sistêmico, onde a produção dos HT no período neonatal é insuficiente. Ocorre em cerca de 1:3.000 a 1:4.000 recém nascidos, sendo uma causa de retardo mental que pode ser prevenida quando diagnosticada e tratada precocemente. O HC é diagnosticado após a triagem neonatal, através do “teste do pezinho”, e a etiologia é determinada aos três anos de idade. O início do tratamento de HC deve ser iniciado o quanto antes para evitar prejuízos no desenvolvimento do sistema neuropsicomotor (5, 6).

O HC primário, acometendo a glândula tireoide, é caracterizado por níveis elevados de TSH em resposta a níveis reduzidos de HT, que é essencial para o desenvolvimento do cérebro durante a fase fetal e início de vida pós-natal, sendo assim, o hipotireoidismo não tratado vai causar déficits cognitivos e motores. A gravidade desses problemas no neurodesenvolvimento dependerá da gravidade e da duração do estado de hipotireoidismo (7). O HC secundário acomete a hipófise em decorrência de mutações em fatores de transcrição envolvidos na organogênese, como POU1F1, PIT1, LHX3, entre outros. A sua frequência é muito rara, e está sempre associada a outras deficiências hipofisárias, além do TSH, principalmente GH e gonadotrofinas (2).

A incidência do HC pode variar dependendo da etnia, consanguinidade e área geográfica. A maior prevalência ainda é em hispânicos e caucasianos, e mais frequente no sexo feminino. Com o passar dos anos, a incidência do HC vem aumentando devido à diminuição dos valores de corte do TSH neonatal (TSHneo), além disso, atualmente existe uma grande migração de populações mais afetadas para áreas de baixa incidência, contribuindo para este aumento (8-10).

Estudos brasileiros recentes mostram uma incidência de HC de 1:2.876 em Santa Catarina (11) e 1:4.632 em Tocantins (12). Os valores mundiais diferem devido aos diferentes valores de corte utilizados por cada país, bem como diferenças étnicas, sócio culturais e territoriais. Alguns dados atuais mostrados na Tabela 1 retratam estas diferenças.

Tabela 1: Estudos retrospectivos publicados entre 2010 e 2014 mostrando a prevalência do HC em diversos países

País	Período	TSH mU/L	Incidência	Referência
Argentina, Buenos Aires	1997-2002	15	1:3.108	(13)
	2003-2012	10	1:2.367	
Brasil, Santa Catarina	2004-2008	5,5	1:2.876	(11)
Brasil, Tocantins	1995-2011	20	1:4.632	(12)
China Continental	1981-2011	10	1:2.034	(14)
Egito, Faiyum	2003-2011	15	1:3.587	(15)
Espanha, Murcia	2007-2010	-	1:1.884	(16)
EUA, Califórnia	2005-2010	-	1:1.706	(17)
Índia, Chandigarh	2007-2009	10	1:3.400	(18)
Irã, Azerbaijan	2009-2010	20	0,50417	(19)
Irã, Babol	2006-2008	10	1:1.754	(20)
Irã, Fars	2006-2007	5	1:1.465	(21)
Irã, Guilan	2006-2010	5	0,47569	(22)
Irã, Isfahan	2002-2009	10	1:1.133	(23)
Itália, Lombardia	1999-2002	12	1:1.446	(10)
	2003-2005	10	1:1.446	
Tailândia, Sul	2000-2009	25	1:1.690	(24)

Os pacientes com HC primário e permanente são divididos em dois grupos: aqueles que apresentam erros inatos da biossíntese dos HT (disormonogênese), geralmente associados com aumento da glândula (bócio) e respondem por cerca de 10-15% dos

casos; e aqueles que apresentam defeitos no desenvolvimento da tireoide (disgenesia), esse grupo responde por 80-85% dos casos (25).

Os defeitos no desenvolvimento da tireoide são, frequentemente, casos esporádicos, sendo mais comuns em meninas, hispânicos, pacientes com síndrome de Down, portadores de doenças cardíacas congênitas e luxação congênita do quadril (26). Os fenótipos da disgenesia variam entre hipoplasia (cerca de 5% dos casos), ectopia (48-61% dos casos) e agenesia (15-33% dos casos), os aspectos morfológicos, porém, são oriundos de eventos moleculares distintos. Apenas 5% dos pacientes apresentam mutações em genes candidatos. Os fatores de transcrição NKX2.1, FOXE1, PAX8 e HHEX, presentes desde os primeiros estágios da embriogênese tireoidiana, o TSHR e os fatores de maturação HOXA3 e EYA1, expressos durante os estágios mais avançados da organogênese, podem estar envolvidos (2, 27, 28).

A disormonogênese tireoidiana (DT) é uma doença causada por erros inatos em um dos mecanismos necessários para a síntese dos HTs. A herança é autossômica recessiva e muito frequentemente leva ao aumento da glândula (bócio), como consequência dos elevados níveis de TSH (29). O diagnóstico etiológico da DT é realizado através de testes clínico-laboratoriais (tireoglobulina sérica, teste de descarga de perclorato) e moleculares (30). A DT pode ocorrer devido a um defeito molecular em qualquer uma das etapas da síntese ou da secreção dos hormônios (Figura 1) (31). Já foram descritas mutações nos genes *simportador de sódio/iodo (NIS)* (32), *pendrina (SLC26A4)* (33), *dual oxidase 2 (DUOX2)* e *dual oxidase maturation factor 2 (DUOXA2)* (34), *tireoperoxidase (TPO)* (35), *tireoglobulina (TG)* (36) e *iodotirosina dealogenase 1 (DEHAL-1)* (37).

O defeito mais comum da síntese hormonal tireoidiana ocorre durante a organificação do iodeto. A organificação é fundamental na formação dos hormônios e

falhas nesta etapa comprometem a produção de peróxido (H_2O_2), a peroxidação do iodeto ou a iodinação das tirosinas. O defeito mais frequente é na TPO, seguido pelas proteínas DUOX2 e DUOXA2 (25, 31, 38). Níveis elevados de TG sérica, captação de iodo radioativo elevada e precoce (em 2 horas) e teste de descarga de perclorato positivo com uma queda significativa definem o diagnóstico clínico-laboratorial de defeito na organificação do iodeto (DOI). Pacientes com DOI têm um grau variável de hipotireoidismo primário e aumento da glândula tireoide, dependendo da gravidade do defeito (39). O defeito pode ser parcial (descarga de perclorato entre 20-80%) ou total (descarga de perclorato maior que 80%) (40).

1.3 Tireoperoxidase

A tireoperoxidase (TPO) (OMIM *606765) é uma hemoglicoproteína específica da tireoide, que se localiza na membrana apical do tireócito com o domínio catalítico voltado para o coloide. A enzima é responsável por três reações importantes na hormonogênese: oxidação do iodeto, iodação da tireoglobulina e acoplamento das tirosinas iodinizadas. A atividade enzimática da TPO é dependente da associação com um grupo heme (41).

O gene que codifica a TPO humana está localizado no cromossomo 2q25 e a sequência completa é formada por 150kpb e dividida em 17 exons (42). A produção dos hormônios tireoidianos é estimulada pela ligação do TSH com o seu receptor de membrana TSHR. Os níveis elevados de TSH aumentam a quantidade de TPO e sua migração para a membrana apical (35, 43). A transcrição do gene *TPO* é controlada pelos fatores de transcrição NKX2.1, FOXE1 e PAX8, que possuem sítios de ligação específicos na região promotora do gene *TPO* (44).

O mRNA da TPO contém 3.048pb e possui sequência altamente heterogênea devido à presença de 34 polimorfismos (<http://www.uniprot.org/uniprot/P07202>), e a proteína TPO possui 933 aminoácidos com peso molecular aproximado de 105 kDA (42). A TPO apresenta 8 diferentes isoformas, sendo TPO1 a espécie de mRNA normal que inclui todos os 17 exons (Figura 3).

Figura 3: Esquema representativo das 8 variantes da TPO indicando as perdas ao longo de cada isoforma

De todas as variantes, a TPO3 e a TPO4 são as únicas ativas, mas apresentam tempo médio de vida curto (45), sendo apenas a TPO3 presente em tecido tireoidiano normal e em pacientes com doença de Graves. As TPOs menores são produtos de *splicing* alternativo da TPO1, gerando sequências alternativas com perdas em diferentes regiões do mRNA (<http://www.uniprot.org/uniprot/P07202>).

A síntese da TPO ocorre no retículo endoplasmático rugoso, sendo então transportada para o complexo de Golgi, glicosilada e por fim transferida para a membrana apical pelas vesículas exocíticas do aparelho Golgiense (46).

O monômero pré-proteico é composto por um peptídeo sinal de 14 aminoácidos seguido por um polipeptídeo de 919 resíduos, incluindo um grande domínio extracelular, um transmembrana e uma pequena calda intracelular (47). A enzima

apresenta cinco sítios de glicosilação, duas pontes dissulfeto e sítios de ligação do grupo heme (48). A sequência de aminoácidos da TPO humana entre os exons 5 e 12 apresenta semelhanças significativas com outras heme peroxidases animais. O sítio catalítico é codificado pelos exons 8 ao 10, região de ligação do grupo heme (essencial para a atividade enzimática), os exons 13 e 14 codificam os domínios de ligação CCP-like e EGF-like. O exon 15 codifica o domínio transmembrana e o 16 e 17, a extremidade intracelular (Figura 4) (47).

Figura 4: Representação esquemática da TPO mostrando as divisões estruturais e principais domínios da proteína de acordo com a sequência de cada exon

Para que a TPO exerça suas funções, é necessária a correta localização da proteína na membrana apical, a preservação da sua estrutura proteica e o sítio catalítico deve estar intacto (47). Mutações no gene *TPO* podem provocar erros na estrutura da proteína, fazendo com que esta fique presa no retículo endoplasmático, pode alterar a estrutura terciária, gerar uma proteína truncada, prejudicar a atividade ou alterar sua localização (49).

Mutações no gene *TPO* são as causas mais frequentes de disormonogênese por defeitos de síntese dos HT (40). Até o momento foram descritas 70 mutações ao longo de todo o gene *TPO* (Anexo A, Tabela 10): 38 mutações *missense* e 6 *nonsense*; 7 em

sítios de *splicing*, 14 deleções e 5 inserções. Todas essas mutações foram identificadas em pacientes com HC por DOI (total ou parcial).

Um dado relevante é a presença de mutações monoalélicas na TPO em casos de disormonogênese. Apesar do padrão de herança autossômico recessivo (29), casos de um único alelo mutado foram descritos em pacientes brasileiros (50, 51) e em diversos pacientes de outras procedências(52-56). Uma das hipóteses para este tipo de fenômeno genético, seria a presença de importantes alterações em regiões intrônicas (criando um *splicing* alternativo) ou em regiões promotoras dos genes mais de 3.000pb *upstream* (51). Existe ainda a possibilidade da expressão monoalélica do gene no tecido tireoidiano (54), já que aproximadamente 5-10% dos genes autossômicos apresentam expressão monoalélica aleatória em células humanas (57).

1.4 Geração de peróxido de hidrogênio

Por ser uma heme peroxidase, a TPO requer por definição peróxido de hidrogênio para sua função. O H_2O_2 age como cofator enzimático na reação de oxidação do iodeto, e é gerado dependendo da transferência de elétrons de uma enzima NADPH. A família de NADPH oxidases é composta por sete membros, denominados Nox1 à Nox5, Duox1 e Duox2. A homologia entre todos os membros baseia-se no domínio bem caracterizado NADPH oxidase, que é responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio (34, 58).

O núcleo catalítico gerador de H_2O_2 na tireoide é o DUOX, uma flavoproteína NADPH-dependente. As duas isoformas DUOX1 e DUOX2 tem uma similaridade de 83% em suas sequências e seus genes estão localizados em estreita proximidade no cromossomo 15. As DUOXs são altamente expressas não apenas nas células foliculares

tireoidianas, mas também em células epiteliais da mucosa gastrointestinal e broncopulmonar (34).

Para que ocorra a geração de H_2O_2 é necessária a formação de um complexo heterodimérico de DUOX com o fator de maturação DUOXA. Os genes *DUOX* e *DUOXA* são contíguos e compartilham o mesmo promotor ativo bidirecional. Isso significa que cada isoforma DUOXA está localizada no mesmo cromossomo em um arranjo “cabeça a cabeça” com sua isoforma correspondente DUOX (Figura 5) (58, 59).

Figura 5: Arranjo dos genes *DUOX1* e *DUOX2* e seus fatores de maturação *DUOXA1* e *DUOXA2* no cromossomo 15. Fonte: Kopp, P 2013 (60)

O complexo DUOX/DUOXA se localiza na membrana apical do tireócito (Figura 6). Apenas os complexos DUOX1/DUOXA1 e DUOX2/DUOXA2 são funcionais, os DUOX1/DUOXA2 e DUOX2/DUOXA1 são instáveis. O complexo mais expresso na tireoide e com maior eficiência na produção de H_2O_2 é o DUOX2/DUOXA2 (61).

Os mecanismos que controlam a expressão dos genes *DUOX/DUOXA* na tireoide ainda não foram totalmente caracterizados e a transcrição não está sob controle dos clássicos fatores de transcrição tireoideos (por exemplo, NKX2.1 ou PAX8), não sendo também ativada pela cascata AMPc mediada pelo TSH (62).

Figura 6: Representação esquemática do funcionamento DUOX2/DUOX2A e TPO. O complexo heterodimérico DUOX2/DUOX2A fornece o H_2O_2 necessário para catalisar as reações da TPO (34)

1.4.1 DUOX2

A DUOX2 (OMIM *606759) é uma proteína de multipassagem na membrana apical e possui peso molecular aproximado de 177 kDA. O gene que codifica a DUOX2 está localizado cromossomo 15q21.1 e possui 33 exons. O mRNA contém 6.533 pb e apresenta somente 6 polimorfismos (www.uniprot.org/uniprot/Q9NRD8). A proteína DUOX2 é composta por um peptídeo sinalizador de 26 aminoácidos seguido por um peptídeo de 1.522 aminoácidos (63). Como característica das flavoproteínas, a DUOX2 contém domínios de ligação NADPH e FAD. Contém 3 domínios de ligação EF-hand, 1 domínio de ligação FAD FR-type, 1 domínio oxidorreductase férrico, e 7 extensões hidrofóbicas (domínios transmembrana). A seção N-terminal apresenta similaridade com a família peroxidase (Figura 7) (64).

A produção de DUOX2 ocorre no retículo endoplasmático rugoso, posteriormente N-glicosilada e transportada para a membrana apical do tireócito. DUOX2 é também

expressa no trato gastrointestinal, traqueia, rim, fígado, pulmão, pâncreas, próstata, glândula salivar, reto e testículo (63, 65-68).

Figura 7: Representação esquemática da DUOX2 mostrando as divisões estruturais e principais domínios da proteína

Até o momento foram descritas 25 mutações ao longo de todo o gene *DUOX2* (Anexo A, Tabela 10): 11 mutações *missense*, 6 *nonsense*, 1 em sítios de *splicing*, 1 indel, 3 deleções e 1 inserção. Mutações no gene *DUOX2* são descritas principalmente na porção extracelular da proteína (onde interage com a TPO) ou na região de ligação do cálcio (64). A identificação de mutação no gene *DUOX2* tem se mostrado cada vez mais relevante nos casos de disormonogênese. Contudo, a correlação fenótipo-genótipo ainda não é muito bem estabelecida, já que poucos pacientes são avaliados para mutações neste gene (69). Apenas uma correlação foi realizada por Muzza e col., onde os pacientes apresentavam TSH elevado com baixos níveis de T4L e elevada prevalência de bócio. Os níveis séricos de TG e o valor de descarga de perclorato foram maiores nos casos de defeito na *DUOX2*, sem correlação com o tipo de mutação e a severidade ou duração do HC (64).

A inativação bialélica do gene *DUOX2* resulta em um bloqueio parcial na geração de H_2O_2 , isso porque, presumivelmente, a *DUOX1* seria capaz de suprir a produção de H_2O_2 no tireócito (70). Mutações no gene *DUOX2* são descritas principalmente na porção extracelular da proteína (onde interage com a TPO) ou na região de ligação do cálcio (64).

1.4.2 DUOXA2

Para que ocorra a maturação da *DUOX2* e sua correta localização na membrana plasmática, é necessária a presença e plena funcionalidade da *DUOXA2*. Grasberger e seus colaboradores demonstraram que na inativação do *DUOXA* a *DUOX* permanece no retículo endoplasmático em estado imaturo (70). As duas proteínas são expressas em conjunto, e essa coexpressão garante a geração do H_2O_2 . A *DUOXA2* é especificamente expressa em tecido tireoidiano e também foi detectada em glândula salivar (71).

O gene que codifica a *DUOXA2* (OMIM *612772) apresenta um arranjo cabeça a cabeça com o gene *DUOX2*, separados por 135pb. Também está localizado no cromossomo 15q21.1 e é dividido em 6 exons. O mRNA contém 1760pb e codifica uma proteína de 320 aminoácidos com cinco domínios trans membrana, apresenta um produto de splicing alternativo, gerando uma proteína não funcional. A *DUOXA2* possui uma porção N-terminal extracelular (tipo III) e 3 sítios de N-glicosilação agrupados entre as hélices 2 e 3 (Figura 8) (71).

Apenas uma mutação nonsense em homozigose foi identificada no gene *DUOXA2* (Anexo A, Tabela 10) (59). O estudo de mutações no gene *DUOXA2* ainda é recente, o que justifica a existência de apenas uma mutação descrita. Contudo, a relevância dessa proteína para a funcionalidade do sistema gerador de H_2O_2 é bem determinada.

Figura 8: Representação esquemática da DUOX2 mostrando as divisões estruturais da proteína

1.5 Estudos anteriores e seleção dos pacientes

Em estudo anterior realizado pela Dra Cristine Barbosa Beltrão, foram avaliados pacientes com HC após os 3 anos de idade para estabelecimento do diagnóstico etiológico, através de dosagem de TG sérica, ultrassonografia, captação e mapeamento da tireoide com ^{131}I (30). A casuística foi composta por 40 crianças com hipotireoidismo congênito permanente com idade média de 5,4 anos e o estudo diagnosticou: 13 ectopias, 8 hipoplasias, 3 atireoses com TG detectável e 3 atireoses sem TG detectável (72, 73).

Treze pacientes foram diagnosticados com defeito de disormonogênese, por apresentarem tireoide tópica, de tamanho normal ou aumentada. Selecionamos então seis pacientes que apresentaram captação de iodo elevada e teste de perclorato negativo para o estudo do gene *TG* (74), e sete pacientes que apresentaram captação de iodo elevada e teste de perclorato positivo, com queda $>20\%$ por suspeita de defeito na organificação do iodeto para o gene *TPO* (40).

Concluimos o estudo molecular dos dois genes candidatos. Na análise do gene *TG*, identificamos 17 polimorfismos já descritos na literatura, uma mutação previamente descrita e duas novas alterações. No gene *TPO* identificamos 12 polimorfismos já descritos, uma mutação previamente descrita (p.Q660E) e uma alteração ainda não descrita no momento das análises (p.R584Q). Investigamos 200 controles normais sem doença tireoidiana e nenhum apresentou estas alterações encontradas no gene *TPO*.

A mutação p.Q660E foi identificada em heterozigose em dois dos sete pacientes avaliados. Esta mutação já foi descrita em homozigose em famílias portuguesas com deficiência de TPO (75) e também em heterozigose composta em famílias brasileiras (76) e franco-canadenses (9). Estudos imunohistoquímicos mostraram que a proteína mutada se expressa e se localiza apropriadamente na borda apical da célula folicular. Análises *in silico* sugerem que a estrutura tridimensional da proteína mutada está conservada, porém com alterações eletrostáticas ao redor do sítio catalítico, que poderiam afetar sua atividade, justificando a deficiência enzimática (9).

Identificamos a alteração p.R584Q (rs145499396), que é descrita como um polimorfismo de baixíssima frequência e identificado apenas em heterozigose na população controle estudada (Figura 7). Ao término da nossa análise do gene *TPO*, esta alteração ainda não havia sido descrita em pacientes com DOI. Identificamos a alteração p.R584Q em heterozigose em um dos pacientes que também apresentou a mutação p.Q660E em heterozigose (Caso III) (Anexo B, Tabela 11),. Também identificamos a p.R584Q em homozigose (o que é inédito na literatura) em outro paciente, que possui DOI total (Caso VI) (Anexo B, Tabela 11). Não identificamos nenhuma outra alteração ao longo de toda a região estudada. Esses dados nos levam a cogitar se a alteração p.R584Q associada a outras mutações ou ainda em homozigose poderia levar os pacientes à deficiência da atividade da TPO.

Figura 9: Diversidade da população controle norte americana (4.550 indivíduos) avaliada para a alteração p.R584Q (rs145499396). Estudo realizado em University of Washington (Seattle, WA) e Broad Institute (Cambridge, MA). A alteração foi identificada apenas em heterozigose no grupo estudado

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

1. Pesquisar mutações nos genes *DUOX2* e *DUOXA2* em pacientes com suspeita de defeito na organificação do iodeto;
2. Realizar o estudo funcional da alteração p.R584Q identificada no gene *TPO*.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Os pacientes e seus responsáveis, assim como seus familiares foram esclarecidos sobre os exames realizados e a importância do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo D). O DNA dos pacientes foi previamente extraído seguindo protocolo padrão (77) e avaliado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific Inc.). Os dados clínicos e laboratoriais de cada paciente estão detalhados no Anexo B, Tabela 11.

3.2 Análise molecular dos genes *DUOX2* e *DUOXA2*

Os genes *DUOX2* e *DUOXA2* foram estudados nos sete pacientes com suspeita de defeito na organificação do iodeto a partir de DNA de leucócitos periféricos.

3.2.1 *Polymerase chain reaction* (PCR)

A sequência completa dos genes que codificam a *DUOX2* (*DUOX2*-001 ENST389039) e *DUOXA2* (*DUOXA2*-001 ENST323030), incluindo as regiões intron-exon, foram amplificadas e sequenciadas utilizando iniciadores (*primers*) descritos no Anexo C, Tabela 12.

O volume final das reações foi de 15µL, utilizando o estojo GoTaq® (Promega Corporation) nas seguintes concentrações: 1X de Green GoTaq® Reaction Buffer, 100ng de DNA genômico, 0,2mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), 1U de

GoTaq[®] DNA Polimerase e 0,5pM de cada *primer*. As amostras foram denaturadas a 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de amplificação de: 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Depois do último ciclo, as amostras foram incubadas a 72°C por 10 minutos. O equipamento de termociclagem utilizado foi o Veriti[®] Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation).

3.2.2 Sequenciamento

Os produtos de PCR foram purificados com enzima ExoSAP-IT[®] (USB Corporation, Affymetrix, Inc.) da seguinte maneira: 5µL do amplificado e 1µL de ExoSAP-IT[®] (incubado à 37°C por 15 minutos e 80°C por 15 minutos). Posteriormente, o purificado foi submetido à reação de sequenciamento utilizando o estojo BigDye[®] Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation) da seguinte maneira: 3µL do purificado, 0,1X de Ready Reaction Premix, 1X de BigDye[®] Sequencing Buffer, 0,5pM de *primer* e água q.s.p. 10µL foram incubados à 96°C por 1 minuto e 25 ciclos à 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 2 minutos. As incubações foram realizadas no mesmo equipamento termociclador citado no item 3.2.1.

A eletroforese capilar foi realizada em equipamento ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation), e os resultados foram analisados e comparados com a sequência normal obtida em bases de dados da internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

3.3 Análise funcional TPO p.R584Q

Para o estudo funcional da alteração p.R584Q, utilizamos plasmídios pcDNA (gentilmente cedido pela Prof^a Dra Ileana Rubió, UNIFESP) contendo os genes *TPO* selvagem e mutado, sob controle de um promotor forte (CMV). Os plasmídios foram transfectados em células de mamífero e a atividade oxidativa das proteínas normal e mutada foram comparadas.

3.3.1 Mutagênese sítio-dirigida

A mutagênese sítio dirigida foi realizada com o objetivo de criar um plasmídio mutante, realizando a troca c.1751G>A no gene *TPO*. Utilizamos o estojo comercial *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies), tendo como modelo o plasmídio pcDNA contendo o gene *TPO* selvagem (pTPOwt) (Figura 10). A reação foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando *primers* mutagênicos desenhados pelo programa *QuikChange Primer Design Program* (www.agilent.com/genomics/qcpd) descritos no Anexo C, Tabela 12.

Os plasmídios foram transformados em células ultracompetentes *E. coli* XL-10 Gold, selecionando-se as transformadas por resistência à ampicilina, de acordo com o protocolo do produto. Para a verificação da troca c.1751G>A, as colônias foram diretamente amplificadas e sequenciadas (seguindo protocolo descrito anteriormente nos itens 3.2.1 e 3.2.2) utilizando os iniciadores para amplificação dos plasmídios pTPO descritos no Anexo C, Tabela 12.

Após a confirmação da presença do plasmídio pcDNA contendo o gene *TPO* com a alteração c.1751G>A (pTPO584), a colônia selecionada foi inoculada em meio LB,

contendo ampicilina, e incubada em agitador à 37°C por 12 horas. A extração do DNA do plasmídio foi feita com o *kit* PureYield® Plasmid Midiprep System (Promega Corporation) de acordo com o protocolo do fabricante. O produto foi avaliado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Nano Drop Corporation, Thermo Fisher Scientific Inc.) e armazenado à -20°C até sua utilização.

Figura 10: Representação esquemática do plasmídio pTPOwt

3.3.2 Cultura de células

Células HeLa (ATCC® CCL-2™) (células epiteliais humanas provenientes de câncer cervical) foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM – 4,5g/L D-glucose) suplementado com 10% de soro fetal bovino na presença

de 50U de penicilina e 50µg de estreptomicina para cada mL de meio, em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

As células foram cultivadas em placa de 60cm² com meio trocado a cada 48 horas, até atingirem cerca de 80% de confluência. Para o descolamento das células, utilizamos tripsina, e para o congelamento o meio DMEM foi suplementado com 50% de soro fetal bovino na presença de 50U de penicilina e 50µg de estreptomicina para cada mL de meio e 10% de DMSO.

Para os experimentos *in vitro*, determinamos a resistência das células HeLa à geneticina (G418). O experimento foi realizado em triplicata, onde cerca de 3x10³ células foram inoculadas em placa de 96 poços e feita uma curva de concentrações crescentes de G418, utilizando os valores 500, 600, 700, 800, 900 e 1.000µg de G418 por mL de meio de cultivo. Durante o estabelecimento da curva, o meio de cultivo contendo G418 foi trocado a cada 48 horas e as células avaliadas em microscópio eletrônico Nikon Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc.), verificando-se a aderência das células e morte celular. Após 20 dias, identificou-se a concentração ideal de G418 que leva a 100% de morte celular, sendo 600µg/mL.

3.3.3 Transfecção

As células foram transfectadas por eletroporação. Em 100µL de PBS (tampão fosfato salino), diluiu-se 1,5x10⁶ células e 2ng de plasmídio para cada transfecção (pcDNA, pTPOwt e pTPO584). Todo o volume foi transferido para minicubeta de eletroporação de 2mm, utilizando o equipamento Nucleofector 2b Device (Lonza Group Ltd) com o programa pré-definido “*HeLa – High viability*”. As células foram então transferidas para placa de cultura de 22cm² contendo meio suplementado.

Após 48 horas, iniciou-se o tratamento com G418 para a seleção das células transfectadas. Devido à presença de gene resistente à G418 no plasmídio, apenas as células HeLa positivamente transfectadas sobreviveram à presença do antibiótico, enquanto as células que não continham o plasmídio morreram. Em 20 dias as células transfectadas estavam prontas para serem utilizadas.

3.3.4 Quantificação relativa de TPO

Mesmo utilizando protocolo padrão desenvolvido para este estudo, as amostras podem apresentar diferenças entre a quantidade de plasmídios que foram transfectados nas culturas controle (pcDNA), normal (pTPOwt) e alterado (pTPO584). Portanto, foi necessária a quantificação da TPO presente em cada linhagem transfectada para normalizar os dados do ensaio funcional. A quantificação de cada amostra celular foi realizada por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando o estojo comercial SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation) em equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation).

Para esta análise, o DNA das células transfectadas foi extraído pelo método *salting out* (77). Como controle negativo da reação foi utilizado o DNA de células transfectadas com o pcDNA vazio. Para as reações de qPCR foram utilizadas 0,6µM dos *primers* descritos no Anexo C, Tabela 12, seguindo o protocolo do fabricante. Realizamos diluições do DNA total extraído de cada cultura celular (pcDNA, pTPOwt e pTPO584), com 4 pontos de concentração (50ng, 25ng, 12,5ng e 6,25ng de DNA) em triplicata. Para a curva controle utilizamos 6 diluições de plasmídio pTPOwt puro (100ng, 50ng, 25ng, 12,5ng, 6,25ng e 3,12ng de DNA), também em triplicata. As amostras foram

aquecidas a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Em seguida foi feita a dissociação a 95°C por 10 minutos, 60°C por 1 minuto e 95°C 2 minutos.

Sabendo que os valores de CT (*threshold cycle*) são inversamente proporcionais à quantidade inicial de amostra, se a amostra contiver altas concentrações de TPO, a amplificação é observada já nos primeiros ciclos, e se em baixas concentrações somente nos ciclos posteriores. Foi montado um gráfico com os valores de CT e as quantificações conhecidas da curva para determinar uma equação para calcular a quantificação das amostras.

3.3.5 Ensaio da atividade oxidativa

As células transfectadas foram submetidas ao teste de atividade oxidativa através do kit Amplex[®] Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay (Invitrogen, Life Technologies Corporation), o ensaio utiliza a molécula Amplex Red (10-acetil-3,7-dihidroxfenoxasina) para a detecção de H₂O₂ ou atividade de peroxidases. Na presença de peroxidases, a molécula Amplex Red reage com o H₂O₂, produzindo moléculas oxidadas vermelho-fluorescentes chamadas resorufim (que possui ondas de excitação e emissão máximas de aproximadamente 571nm e 585nm, respectivamente). O ensaio possui alta sensibilidade de detecção em baixos níveis de peroxidases.

Cerca de 3×10^4 células transfectadas foram cultivadas em placa de 96 poços por 24 horas antes do ensaio, utilizando meio suplementado e com G418. Seguiu-se o protocolo padrão do kit e a leitura da fluorescência da molécula de resorufim foi realizada em equipamento VICTOR³ V Multilabel Counter (Perkin Elmer Inc.), com onda de excitação de 530nm e detecção de fluorescência à 590nm.

O cálculo da atividade foi feito a partir da variação da fluorescência captada pelo equipamento entre as amostras que expressam a proteína normal e a alterada. Como controle negativo utilizamos células transfectadas com o plasmídio pcDNA.

A análise dos dados foi feita através do programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, Inc.).

3.4 Análise *in silico*

Para a avaliação da ação de alterações genéticas na estrutura e funcionalidade das proteínas estudadas, foram utilizadas as seguintes ferramentas de bioanálise:

- *PolyPhen-2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>). Analisa a sequência de aminoácidos e a estrutura da proteína, com pontuação entre 0,00 (benigno) e 1,00 (prejudicial);
- *Mutation Taster* (<http://www.mutationtaster.org>). Avalia o grau de diferença entre a estrutura normal e a alterada, com pontuação entre 0,0 (sem diferença) à 215,0 (diferente). O programa ainda avalia a conservação da sequência de nucleotídeos e de aminoácidos, alterações em sítios de *splicing* e alterações na estrutura da proteína;
- *SIFT* (<http://sift.bii.a-star.edu.sg>). Classifica a alteração de acordo com a diferença entre a sequência de aminoácidos normal e alterada, com pontuação entre $\leq 0,05$ (prejudicial) e $>0,05$ (tolerável). O programa indica o número de sequências similares utilizadas na comparação (com média de diversidade ideal entre 2,75 e 3,50);

- *PSIPRED* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>). Prevê possíveis diferenças conformacionais na proteína, de acordo com as sequências normal e alterada de aminoácidos.

4 RESULTADOS

4.1 Estudo molecular

4.1.2 Alterações genéticas no gene *DUOX2*

Nos pacientes estudados, identificamos vinte polimorfismos já descritos (Tabela 2) e uma alteração não descrita na literatura (p.A1087V).

Tabela 2: Polimorfismos identificados no gene *DUOX2* nos pacientes estudados

ID	cDNA	Proteína	Paciente						
			<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>	<i>VI</i>	<i>VII</i>
rs2001616	c.413C>T	p.P138L	T/T	T/T	C/T	T/T	-	C/T	T/T
rs199957468	c.512T>C	p.L171P	-	-	T/C	-	-	-	-
rs2467830	c.558C>T	p.G186G	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T
rs2467829	c.567C>T	p.H189H	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T
rs2467828	c.597G>C	p.S199S	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C
rs2467827	c.598G>A	p.G200R	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A
rs35157799	c.633C>T	p.F211F	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T
rs269860	c.1461G>C	p.G487G	C/C	C/C	C/C	C/C	G/C	C/C	C/C
rs142972079	c.115C>T	p.L505L	-	-	-	-	C/T	-	-
rs57659670	c.2033A>G	p.H678R	-	-	A/G	-	A/G	A/G	-
rs113400262	c.2102G>A	p.R701Q	-	-	-	-	-	G/A	-
rs73406334	c.2286G>A	p.Q762Q	-	-	-	-	-	G/A	-
rs73406330	c.2334+10C>T		-	-	C/T	-	C/T	C/T	-
rs144153950	c.2894C>T	p.S965L	-	-	-	-	-	-	C/T
rs61730030	c.2944C>G	p.P982A	-	-	-	-	-	C/G	-
rs269868	c.3200C>T	p.S1067L	T/T	T/T	C/T	T/T	C/T	C/T	T/T
rs79480907	c.3261G>A	p.A1087A	-	-	G/A	-	G/A	-	-
rs269869	c.3515+15T>A		A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
rs143471358	c.3830C>G	p.A1277G	-	-	-	-	-	C/G	-
rs unknown	c.4552G>A	p.G1518S	-	G/A	-	-	-	-	G/A

ID: identificação do polimorfismo. Em destaque o polimorfismo funcional p.H678R.

4.1.2.1 Nova alteração p.A1087V

Identificamos a substituição de C por T na posição 3.260 do gene *DUOX2* (c.3260C>T), resultando na substituição de uma alanina (aminoácido apolar) por uma valina (aminoácido apolar) na posição 1.087 da proteína (p.A1087V) (Figuras 11 e 12).

Figura 11: Cromatograma de parte do gene *DUOX2* (exon 25) onde foi identificada a troca c.3260C>T (p.A1087V). A) Sequência do controle normal; B) Sequência sense do paciente II; C) Sequência anti-sense do paciente II. Em destaque o nucleotídeo de substituição em heterozigose (C>T ou G>A)

Figura 12: Representação esquemática da *DUOX2* mostrando a posição da alteração p.A1087V na terceira porção transmembrana da proteína

O resultado foi confirmado com nova PCR e sequenciamento. Esta alteração foi identificada em heterozigose no paciente *II* (Figura 11), e em estudo de segregação, verificamos que somente o pai também apresenta esta alteração em heterozigose. Não identificamos a troca em 400 alelos de controles normais sem doença tireoidiana.

De acordo com dados disponíveis na base de dados do *UniProt* para DUOX2 (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9NRD8>), verificamos que a alteração p.A1087V se localiza em 3 importantes domínio da proteína: transmembrana (posição 1.077 à 1.097), oxidoreductase férrico (posição 1.084 à 1.266) e de interação com o gene TXNDC11 (posição 960 à 1.245).

A análise *in silico* da alteração p.A1087V no gene *DUOX2* através do programa *PolyPhen2* mensurou a alteração como sendo “provavelmente prejudicial”, com uma pontuação de 0,957 (sensibilidade de 0,63 e especificidade de 0,92) (Figura 13).

Figura 13: Análise da alteração p.A1087V no gene *DUOX2* gerada pelo programa de bioanálise *PolyPhen2*

Na análise gerada pelo programa *MutationTaster*, a alteração p.A1087V apresentou uma pontuação de 64,0, sendo 0,0 sem diferença em comparação com a estrutura normal. O nucleotídeo c.3260C se mostrou conservado entre as espécies. O sítio de *splicing* localizado na posição gDNA.14518 foi levemente aumentado, com pontuação de 0,2544 para a sequência normal e 0,2894 para a sequência alterada. O alinhamento

da sequência de aminoácidos mostra que a região 1.087 é altamente conservada entre diferentes espécies (Tabela 3).

Tabela 3: Análise da alteração p.A1087V no gene *DUOX2* gerada pelo programa de bioanálise *MutationTaster*

Localização	chr15:45392015G>A	
Símbolo HGNC	DUOX2	
ID do transcrito Ensembl	ENST00000389039	
ID do peptídeo UniProt	Q9NRD8	
Tipo de alteração	Troca de única base	
Região da alteração	Codificadora	
Trocas no DNA	c.3260C>T / cDNA.3646C>T / g.14528C>T	
Troca AA	p.A1087V pontuação: 64	
Frameshift	Não	
Alterações	Não encontrados SNPs na região alterada	
Nucleotídeo	Conservado	
Conservação	Espécies	Alinhamento
	Humano	TLVGIILSRGT A ASVSFMFSYILL
	Mutado	ILSRGT V ASVSFMFSYIL
	<i>P troglodytes</i>	ILSRGT A ASVSFMFSYIL
	<i>F catus</i>	ILSRGT A ASISFMFSYIL
	<i>M musculus</i>	ILSRGT A ASISFMFSYIL
	<i>G gallus</i>	TFVGIILSRGS A ACISFMYSYI
	<i>T rubripes</i>	ARGS A AAVSFLFPYML
	<i>D rerio</i>	SMVGVLVSRGS A AAISFLFPYML
	<i>D melanogaster</i>	GVGIAITRGS A ASLSFCYSLLL
	<i>C elegans</i>	MGAGIAITRGA A GALSFCMALIL
	<i>X tropicalis</i>	IGLIISRG S AASISFMFSYML
Características da proteína	AA: 960-1245	Interação com TXNDC11
	AA: 1077-1097	Transmembrana
	AA: 1084-1266	Oxidoreductase férrico
Tamanho da proteína	Normal	
Sequencia alterada AA	Sim	
Posição códon terminal	wt: 4647/mt: 4647	
Posição AA terminal	wt: 1549/mt: 1549	
Posição códon terminal	wt: c.5033/mt:c.5033	
Posição ATG inicial	wt: c.387/mt: c.387	

A predição para substituições gerada pelo programa *SIFT* mostrou que a alteração p.A1087V é prejudicial, com uma pontuação de 0,0. O programa identificou 48 sequências similares, com uma média de diversidade de 2,75 (Tabela 4).

Tabela 4: Análise da alteração p.A1087V no gene *DUOX2* gerada pelo programa de bioanálise *SIFT*

Coordenadas	15,45392015,1,G/A
Códons	GCG-GtG
Substituição	A1087V
Região	EXON CDS
dbSNP ID	Novo
Tipo do SNP	Não sinônimo
Predição	PREJUDICIAL
Pontuação	0
Med diversidade seq	2,75
# Seqs na posição	48
Gene ID	ENSG00000140279
Gene	DUOX2
OMIM	THYROID DYSHORMONOGENESIS 6

O programa *PSIPRED* não mostrou alterações na conformação da estrutura secundária da proteína na presença da alteração p.A1087V (Figura 14).

Figura 14: Análise da alteração p.A1087V no gene *DUOX2* gerada pelo programa de bioanálise *PSIPRED*. Em destaque a região 1.087

4.1.2.2 Polimorfismo p.H678R

Dentre os polimorfismos identificados no gene *DUOX2*, identificamos o p.H678R (rs57659670), que é descrito como um polimorfismo funcional (69). Este SNP foi identificado em heterozigose nos pacientes III, V e VI (Tabela 2). A atividade funcional deste SNP já foi anteriormente avaliada em estudo *in vitro*, apresentando leve diminuição da atividade da DUOX2 na presença deste polimorfismo em comparação ao normal (69) (78) (Figura 15).

Figura 15: Propriedades funcionais do polimorfismo p.H678R (69). A capacidade de produção de H₂O₂ das proteínas DUOX2 foram medidas com o reagente *AmplexRed* na presença de DUOXA2-myc co-transfectado. O estudo de Narumi e cols. mostrou uma alta retenção da atividade ($85 \pm 3\%$) em comparação ao normal (WT)

Utilizando as ferramentas de bioanálise, observamos no PolyPhen2 que o polimorfismo p.H678R (rs57659670) foi classificado como benigno, com pontuação 0,0 (sensibilidade 1,0 e especificidade 0,0) (Figura 16).

Figura 16: Análise do polimorfismo p.H678R no gene *DUOX2* gerada pelo programa de bioanálise *PolyPhen2*

No SIFT, o polimorfismo foi considerado tolerável, com pontuação 1, comparado com 48 sequências similares e com média de diversidade de 2,75 (Tabela 5).

Tabela 5: Análise do polimorfismo p.H678R no gene *DUOX2* gerada pelo programa de bioanálise *SIFT*

Coordenadas	15,45398438,1,T/C
Códons	CAT-CgT
Substituição	H678R
Região	EXON CDS
dbSNP ID	rs57659670
Tipo do SNP	Não sinônimo
Predição	TOLERÁVEL
Pontuação	1
Med diversidade seq	2,75
# Seqs na posição	48
Gene ID	ENSG00000140279
Gene	DUOX2
OMIM	THYROID DYSHORMONOGENESIS 6

No *MutationTaster* a troca p.H678R apresentou uma pontuação de 29, com nucleotídeo não conservado. Ainda houve um possível ganho de um sítio doador de *splicing* na posição gDNA.8099, com pontuação de 0,98. O programa ainda previu diversas regiões de perda devido a este *splicing* alternativo. O alinhamento da sequência

de aminoácidos mostra que a região 678 não é conservada entre diferentes espécies (Tabela 6).

Tabela 6: Análise do polimorfismo p.H678R no gene *DUOX2* gerada pelo programa de bioanálise *MutationTaster*

Localização	chr15:45398438T>C	
Símbolo HGNC	DUOX2	
ID do transcrito Ensembl	ENST00000389039	
ID do peptídeo UniProt	Q9NRD8	
Tipo de alteração	Troca de única base	
Região da alteração	Codificadora	
Trocas no DNA	c.2033A>G / cDNA.2419A>G / g.8105A/G	
Troca AA	H678R pontuação: 29	
Frameshift	Não	
Alterações	rs57659670 / CM085365	
Nucleotídeo	Não conservado	
Conservação	Espécies	Alinhamento
	Humano	LSDRCLQVLNR HL TVLRVVQLQPL
	Mutado	LSDRCLQVLNR RL TVLRVVQLQPL
	P troglodytes	LSDRCLQVLNR RL TVLRVVQLQPL
	F catus	LPDRRLQVLDR RL SVLRVTVQLQP
	M musculus	LPDRSLQVLDR R FTVLRRTIQLQS
	G gallus	QADKVLKVLDG R GLMLRSVSLNA
	T rubripes	EKRVQVCDR S GAVLRRCFDLGV
	D rerio	SEKKVFQTFDE NG SPLSSH
	D melanogaster	GPEAAIYTVDR K GEKLRTFSLKH
	C elegans	ENTTLAVKKP R GGILRKIRFET
	X tropicalis	NQILKVLD S KKKPRVVNLHK
Características da proteína	AA: 623-1041	Citoplasmático
Tamanho da proteína	Normal	
Sequencia alterada AA	Sim	
Posição códon terminal	wt: 4647 / mu: 4647	
Posição AA terminal	wt: 1549 / mu: 1549	
Posição códon terminal	wt: c.5033 / mu: c.5033	
Posição ATG inicial	wt: c.387 / mu: c.387	

O programa *PSIPRED* não mostrou alterações na conformação da estrutura secundária da proteína DUOX2 (Figura 17).

AA:	AMEWPGPKERSSP	IIQLLS	DRCLQVL	NRH	LT	VLRVV	QLQPL	QQVNL	ILSN	NRG	CRTL
CF:	885069998864369998799809998	08998	12698499997499999617997169								
NL:	EEEECCCCCCCC	EEEECCCC	EEEECCCC	EEEECCCC	EEEECCCC	EEEECCCC	EEEECCCC	EEEECCCC	EEEECCCC	EEEECCCC	EEEECCCC
AL:	EEEECCCCCCCC	EEEECCCC	EEEECCCC	EEEECCCC	EEEECCCC	EEEECCCC	EEEECCCC	EEEECCCC	EEEECCCC	EEEECCCC	EEEECCCC
CF:	887309999972079998599638976	08887	44899689897489999607996169								
AA:	AMEWPGPKERSSP	IIQLLS	DRCLQVL	NRRL	T	VLRVV	QLQPL	QQVNL	ILSN	NRG	CRTL
	650	660	670	680	690	700					
H:	helix										
E:	strand										
C:	coil										
AA:	sequencia										
CF:	confiabilidade da predição										
NL:	predição da estrutura secundária normal										
AL:	predição da estrutura secundária alterada										

Figura 17: Análise da alteração p.H678R no gene *DUOX2* gerada pelo programa de bioanálise *PSIPRED*. Em destaque a região 678

4.1.2 Alterações genéticas no gene *DUOX2*

A análise da sequência do gene *DUOX2* permitiu identificar cinco polimorfismos previamente descritos na literatura (Tabela 7). Nenhuma outra alteração foi identificada nas regiões estudadas.

Tabela 7: Polimorfismos identificados no gene *DUOX2* nos pacientes estudados

ID	cDNA	Proteína	Pacientes						
			I	II	III	IV	V	VI	VII
rs2576090	c.298C>G	p.R100G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
rs2252371	c.341-15C>T	-	C/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T
rs2554459	c.341-4A>G	-	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
rs2576092	c.554+6T>C	-	T/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
rs955152	c.555-18C>T	-	C/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T

ID: identificação.

4.2 Estudo funcional da mutação p.R584Q da TPO

Células HeLa transfectadas com os plasmídios pcDNA, pTPOwt e pTPO584, foram estabilizadas com G418 durante 20 dias e utilizadas para avaliar o efeito da alteração p.R584Q na TPO.

Primeiramente, foi realizada a quantificação de TPO presente nas células HeLa. Ao final, obtivemos uma curva para o cálculo da quantificação das amostras (Figura 18).

Figura 18: Curva de quantificação utilizada para calcular o número de cópias virais presentes nas células transfectadas (escala linear)

k

Observamos que as amostras contendo o plasmídio alterado apresentaram valores de CT menores em relação às amostras contendo o plasmídio normal (Figura 19), o que indica maior número de cópias virais nas células transfectadas com o pTPO584. Dessa forma, pudemos normalizar os dados de acordo com a quantidade de plasmídios presente em cada cultura celular.

Figura 19: Quantificação das amostras pTPOwt e pTPO584 mostrando as diferenças de CT entre as amostras nas diversas diluições (escala linear)

Em seguida foi realizado o ensaio da atividade peroxidativa da TPO através do sistema *AmplexRed*. A intensidade de fluorescência gerada pelo equipamento, normalizada com os dados de quantificação das amostras, gerou o gráfico mostrado na Figura 20.

Figura 20: Ensaio da atividade oxidativa da TPO, mostrando a atividade extracelular das proteínas normal e alterada, de acordo com a intensidade da fluorescência gerada durante o ensaio. * $p < 0,05$

Os dados foram submetidos ao Teste T não pareado, com resultados significativamente estatísticos ($p=0,0193$).

Também avaliamos a mutação p.R584Q *in silico*. No *PolyPhen-2*, a alteração foi classificada como provavelmente prejudicial, com pontuação 1,0 (sensibilidade 0,0 e especificidade 1,0) (Figura 21).

Figura 21: Análise da alteração p.R584Q no gene *TPO* gerada pelo programa de bioanálise *PolyPhen-2*

No *SIFT* a mutação p;R584Q foi classificada como prejudicial, com pontuação 0, comparada com 174 sequências similares e média de diversidade de 2,73 (Tabela 8).

Tabela 8: Análise da alteração p.R584Q no gene *TPO* gerada pelo programa de bioanálise *SIFT*

Coordenadas	2,1491746,1,G/A
Códons	CGG-CaG
Substituição	R584Q
Região	EXON CDS
dbSNP ID	rs145499396
Tipo do SNP	Nonsynonymous
Predição	PREJUDICIAL
Pontuação	0
Med diversidade seq	2,73
# Seqs na posição	174
Gene ID	ENSG00000115705
Gene	TPO

Observamos no *MutationTaster* uma pontuação de 43, com nucleotídeo conservado. O sítio de *splicing* localizado na posição gDNA.113745 foi levemente aumentado, com pontuação de 0,22 para a sequência normal e 0,35 para a sequência alterada. Houve ainda o possível ganho de dois sítio de *splicing* nas posições gDNA.113748 (pontuação de 0,53) e gDNA.113754 (pontuação de 0,30). O alinhamento mostra que a região 584 é conservada (Tabela 9).

Tabela 9: Análise da alteração p.R584Q no gene *TPO* gerada pelo programa de bioanálise *MutationTaster*

Localização	chr2:1491746G>A	
Símbolo HGNC	TPO	
ID do transcrito Ensembl	ENST00000329066	
ID do peptídeo UniProt	P07202	
Tipo de alteração	Troca de única base	
Região da alteração	Codificadora	
Trocas no DNA	c.1751G>A / cDNA.1834G>A / g.113752G>A	
Troca AA	R584Q Pontuação: 43	
Frameshift	Não	
Alterações	rs145499396	
Nucleotídeo	Conservado	
Conservação	Espécies	Alinhamento
	Humano	LDLASINLQRG RD HGLPGYNEWRE
	Mutado	LDLASINLQRG QD HGLPGYNEWRE
	M musculus	LDLASLN L QRG RD HGLPDYNEWRE
	C elegans	LDLAALNIQ R GDHGLPSWTEYR
Características da proteína	AA	Domínio
	19-846	Extracelular
Tamanho da proteína	Normal	
Sequencia alterada AA	Sim	
Posição códon terminal	wt: 2802 / mu: 2802	
Posição AA terminal	wt: 934 / mu: 934	
Posição códon terminal	wt: c.2885 / mu: c.2885	
Posição ATG inicial	wt: c.84 / mu: c.84	
OMIM	THYROID DYSHORMONOGENESIS 6	

O programa *PSIPRED* não mostrou alterações na conformação da estrutura secundária da proteína TPO (Figura 22).

CF: 572989986126899987224575631	02348	99971676742099999995668831
AA: LMNEELTERLFVLSNSSTLDIASINLQ	RGRDH	GLPGYNEWREFCGLPRLETPADLSTA
NL: CCCHHHHHHHCCCCCCCCCHHHHHHHH	CCCCC	CCCCCHHHHHHHHHCCCCCCCCCHHHHHHH
AL: CCCHHHHHHHCCCCCCCCCHHHHHHHH	CCCCC	CCCCCHHHHHHHHHCCCCCCCCCHHHHHHH
AA: LMNEELTERLFVLSNSSTLDIASINLQ	RGRDH	GLPGYNEWREFCGLPRLETPADLSTA
CF: 462989986126899987224575631	01348	99981676642099999995668831
560	570	580
590	600	610
H: helix	AA: sequencia	
E: strand	CF: confiabilidade da predição	
C: coil	NL: predição da estrutura secundária normal	
	AL: predição da estrutura secundária alterada	

Figura 22: Análise da alteração p.R584Q no gene *TPO* gerada pelo programa de bioanálise *PSIPRED*

5 DISCUSSÃO

Os defeitos congênitos de síntese hormonal tireoidiana ocasionados por falha total na fase de organificação do iodeto são frequentemente causados por alterações no gene *TPO*, já uma falha parcial pode também ser associada a alterações nos genes *SLC26A4*, *TG*, *DUOX2* ou *DUOXA2* (64).

A atividade da TPO é essencial na síntese dos HTs, que está envolvida na iodação dos resíduos de tirosina e também no acoplamento das tirosinas iodadas. O sistema gerador de H_2O_2 deve estar em plena funcionalidade, já que a atividade da TPO depende desse doador de elétrons. Esse sistema depende da ação conjunta das enzimas *DUOX2* e *DUOXA2*, que são coexpressas e formam um complexo gerador de H_2O_2 (34, 35).

5.1 Avaliação molecular dos genes *DUOX2* e *DUOXA2*

Os sete pacientes clinicamente diagnosticados com DOI, sendo parcial ou total, tiveram seu estudo molecular dos genes *DUOX2* e *DUOXA2* concluído. Não identificamos mutações descritas na região estudada de ambos os genes, e apenas um paciente apresentou uma alteração não descrita na literatura no gene *DUOX2*.

A nova alteração p.A1087V do gene *DUOX2* não foi identificada nos 400 alelos do grupo controle estudado. Através de estudo dos pais conseguimos verificar a segregação, onde o pai é carreador da alteração p.A1084V em heterozigose, assim como o caso II. Infelizmente, o pai do paciente não foi submetido à exames diagnósticos para verificar a funcionalidade da glândula tireoide, e não apresenta hipotireoidismo.

Com o uso de ferramentas de bioanálise, verificamos que a troca p.A1084V é provavelmente prejudicial para o correto funcionamento da proteína *DUOX2*. Na troca,

ambos os aminoácidos selvagem e alterado possuem caráter apolar, sendo assim não acarretaria alterações conformacionais da proteína, o que foi confirmado na análise da predição da estrutura secundária (Figura 14). Contudo, a alteração p.A1084V se localiza dentro de um domínio transmembrana, de um domínio oxidoredutase férrico e ainda de um domínio de interação com o gene TXNDC11 (Tabela 3). Portanto, apesar de não provocar uma alteração conformacional, a troca de aminoácidos certamente acarreta diferenças eletrostáticas ou de função, impedindo a correta ação da proteína.

O prejuízo da função da DUOX2 pode também ser visto na análise comparativa, onde o aminoácido alterado é altamente conservado entre as diferentes espécies (Tabela 3). Apenas estudos enzimáticos poderão definir se houve e qual foi o percentual de perda de atividade da DUOX2 ocasionada por esta alteração.

Dentre os polimorfismos identificados no gene *DUOX2*, o p.H678R (rs57659670) é descrito como um polimorfismo funcional. De Marco e cols. identificaram mutações no gene *DUOX2* e foram os primeiros a analisar a alteração p.H678R. Eles concluíram que se trata de um polimorfismo, pois foi identificado em 13% (8/60) do seu grupo controle. Além disso, demonstraram que a atividade da DUOX2 mantém-se a mesma quando as células HeLa foram transfectadas com p.H678R. A variante está expressa normalmente na superfície celular, como esperado na proteína selvagem. Portanto esta alteração não impediria a produção de H_2O_2 (78).

Narumi e cols. também identificaram a variante p.H678R em pacientes com DOI, tanto em homo quanto em heterozigose. Um paciente portador de p.H678R também apresentava uma mutação monoalélica no gene *TSHR*. A análise funcional da variante p.H678R mostrou discreta perda da função da DUOX2 ($85\pm 3\%$, $P<0,05$), não esclarecendo a sua patogenicidade. Em contrapartida, através de experimentos com RT-PCR para testar o defeito a nível de RNA, mostraram que a presença monoalélica de

p.H678R determinou uma leve diminuição da expressão ($72\pm 6\%$), o que implica na coexistência de um defeito a nível de RNA. A frequência alélica de p.H678R foi alta nos pacientes com DOI, pois parece também ser mais frequente na população japonesa. Por isso, o DOI não pode ser explicado apenas pela presença de p.H678R. Os autores presumem que o alelo que carrega a p.H678R seria patogênico apenas se existir outra mutação reguladora, assim combinando um defeito no nível de RNA e proteína, como ocorreu no paciente com mutação no TSHR e p.H678R DUOX2 (69). Na nossa população controle, a troca p.H678R não foi identificada, reforçando a participação deste polimorfismo na apresentação clínica dos nossos pacientes. Também poderíamos considerar que exista uma ligação entre as variantes por desequilíbrio de ligação. É de se notar, que identificamos esse polimorfismo somente em nossa coorte de pacientes com DOI.

O SNP p.H678R foi identificado em três dos nossos pacientes (casos III, V e VI) em heterozigose e não identificamos nenhuma outra alteração na região avaliada do gene *DUOX2* nestes pacientes. As análises feitas pelos programas *MutationTaster*, *PolyPhen2* e *SIFT* mostraram que a alteração não é potencialmente prejudicial.

A princípio, a presença de mutação no gene *DUOX2* é rara e a presença da variante p.H678R continua indefinida, podendo somente modular a apresentação clínica de pacientes com DOI causada por mutações em outros genes.

5.2 Avaliação funcional da alteração TPO p.R584Q

O estudo funcional da alteração p.R584Q (rs145499396) foi concluído. A p.R584Q foi descrita no *dbSNP Short Genetic Variations* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) em 2011 pelo grupo *NHLBI Exome Sequencing Project*, onde foram avaliados 4.550

controles norte americanos disponíveis no banco de dados do grupo. O alelo heterozigoto A/G foi identificado com 0,1% de frequência, e o alelo homozigoto alterado A/A não foi identificado nesta população. Até o momento não foi relatada nenhuma correlação clínica da alteração, bem como informações sobre a frequência do alelo menor global (MAF).

A variante p.R584Q foi identificada em homozigose pela primeira vez (caso VI) e em heterozigose (caso III) como descrito anteriormente na base de dados do *dbSNP*. O estudo de segregação do caso III não pôde ser realizado, pois o paciente é órfão. No caso VI, ambos os pais apresentavam a alteração em heterozigose, e não possuem hipotireoidismo, apesar dos testes de captação não terem sido realizados.

A falta de dados conclusivos sobre as consequências moleculares da troca p.R584Q na TPO motivou a avaliação funcional desta alteração. Verificamos que a alteração provocou uma diminuição da atividade da TPO, permanecendo uma atividade residual de somente 5% ($p < 0,05$) (Figura 20), o que certamente levaria ao defeito de organificação do iodeto nos pacientes.

Além disso, as análises *in silico* mostraram que a alteração p.R584Q é provavelmente prejudicial, reforçando os resultados *in vitro*. Verificamos ainda, que na troca p.R584Q, o aminoácido selvagem apresenta caráter polar básico, enquanto o alterado apresenta caráter polar neutro. A alteração p.R584Q está localizada dentro da região codificadora do sítio catalítico (codificada pelos exons 8-10), importante para o correto funcionamento da enzima. Portanto, a alteração poderia ocasionar diferenças eletrostáticas ou de função, impedindo a correta ação da proteína.

Mutações inativadoras no gene *TPO* são a maior causa de disormonogênese. Alguns estudos relatam a presença de mutações monoalélicas, provavelmente devido a presença de mutações em regiões regulatórias ou intrônicas não encontradas (35, 51). A

expressão monoalélica da TPO seria outra explicação para casos de DOI, como descrito por Fugazzola e cols. que relataram a expressão monoalélica de TPO mutante de origem maternal em tecido tireoidiano (54). Este fenômeno é relativamente frequente, onde genes autossômicos estão sujeitos à expressão monoalélica aleatória, podendo ocorrer devido a mecanismos de transcrição ou pós transcricionais e eventos epigenéticos (57).

5.3 Análise clínica, laboratorial e molecular dos pacientes

Nos pacientes I, IV e VII não identificamos mutações nas regiões estudadas dos genes *TPO*, *DUOX2* e *DUOXA2*. O caso I apresenta hipotireoidismo, com tireoide tóxica, sem bócio, com níveis elevados de TG sérica e captação de iodo aumentada. Entretanto, o paciente não realizou o teste do perclorato, assim como a audiometria. Postulamos que o paciente pode apresentar mutação no gene *SLC26A4* ou no gene *TSHR*. Mutação no gene *TG* está associada a valores baixos ou indetectáveis de TG sérica, o que torna pouco provável esta etiologia molecular para este paciente, pois apresenta níveis de TG elevados (103 ng/mL).

O caso IV apresenta hipotireoidismo, com tireoide tóxica, sem bócio e valores baixos de TG sérica, atribuído à presença de anticorpo anti-TG, que interfere na determinação correta de TG. O paciente apresenta audiometria normal, discreto aumento da captação de iodo em 2 horas e o teste do perclorato foi positivo. Como não identificamos mutações nos genes estudados, o paciente pode apresentar hipotireoidismo por tireoidite autoimune, que também pode acarretar em um teste do perclorato positivo (1). Entretanto, a tireoidite autoimune causando hipotireodismo neonatal é transitório, por ser em consequência do hipotireoidismo autoimune materno, e hipotireoidismo autoimune em idade tão precoce quanto a deste paciente (3,4 anos) é

extremamente rara. Somente o acompanhamento clínico e laboratorial do paciente poderá auxiliar na determinação da etiologia autoimune. Também não podemos descartar mutações em outros genes envolvidos na disormonogênese, exceto *NIS*.

O caso VII apresenta hipotireoidismo, com tireoide tóxica, sem bócio, com níveis elevados de TG sérica e captação de iodo discretamente aumentada em 2 horas. O paciente apresentou o teste do perclorato positivo e não realizou audiometria. A presença de mutações em outros genes envolvidos na disormonogênese, como *SLC26A4* ou *TSHR*, justificariam a doença neste paciente.

Nos pacientes III, V e VI identificamos alterações tanto no gene *TPO* quanto no gene *DUOX2*. O caso III apresenta hipotireoidismo, com a tireoide tóxica e bócio. Os valores de TG sérica se mostraram elevados, com captação de iodo aumentada, teste do perclorato positivo e audiometria normal, caracterizando clinicamente DOI parcial. Neste paciente identificamos a mutação p.Q660E e a alteração p.R584Q, ambas em heterozigose na TPO. A mutação p.Q660E já é bem descrita na literatura, presente em pacientes com DOI parcial, e mais frequente em heterozigose composta (9). A alteração p.R584Q, apesar de ser descrita como um polimorfismo, se mostrou extremamente deletéria na nossa análise funcional. As variantes, provavelmente, comprometem os dois alelos do paciente, acarretando a DOI parcial, com queda de 67,5% no teste do perclorato, justificando a doença. Além disso, identificamos o SNP p.H678R na *DUOX2* em heterozigose.

O paciente V apresenta hipotireoidismo, com tireoide tóxica, sem bócio, TG sérica elevada e captação de iodo aumentada em 2 e 24 horas. O teste de perclorato foi discretamente positivo e a audiometria foi normal. Neste paciente, identificamos a mutação p.Q660E na TPO em heterozigose, e nenhuma outra alteração neste gene. Também identificamos o SNP p.H678R na *DUOX2* em heterozigose. Este paciente

pode apresentar tanto uma mutação no outro alelo, que não pudemos identificar, como na região promotora. Também postulamos que o a expressão monoalélica desta mutação poderia justificar o hipotireoidismo mais leve, com a DOI leve, mostrada pelo teste do perclorato limítrofe do normal. A presença do polimorfismo p.H678R no DUOX2 também poderia participar no fenótipo deste paciente.

O caso VI apresenta hipotireoidismo, com tireoide tóxica, sem bócio, TG sérica elevada e captação de iodo aumentada em 2 horas. O teste do perclorato foi positivo e o paciente não realizou audiometria. O paciente apresentou a variante p.R584Q em homozigose na TPO, comprometendo assim os dois alelos do gene. A ação deletéria desta alteração como comprovamos *in vitro* pode justificar a DOI total, caracterizada pela queda de 85,7% no teste do perclorato. Também identificamos o SNP p.H678R na DUOX2 em heterozigose.

O caso II apresenta hipotireoidismo, com tireoide tóxica e ausência de bócio. A dosagem de TG sérica se mostrou elevada, com captação de iodo elevada em 2 e 24 horas, teste do perclorato positivo e audiometria normal. Neste paciente identificamos apenas a nova alteração p.A1087V em heterozigose na DUOX2. Nenhuma outra alteração foi identificada nos genes *TPO* e *DUOXA2*. A presença desta alteração em heterozigose reforça a hipótese da expressão monoalélica da mutação no DUOX2 participar do fenótipo de DOI parcial, que só poderia ser comprovada em estudos com o tecido do paciente.

Não podemos afirmar se as alterações presentes em diferentes proteínas envolvidas na síntese hormonal tireoidiana é a causa do hipotireoidismo nos pacientes estudados. Ris-Stalpers e Bikker chegaram a especular que estudos funcionais conjuntos de TPO e DUOX2 podem esclarecer essa hipótese e trazer mais dados para a etiologia genética das doenças congênitas tireoidianas. Variações combinadas de diferentes proteínas

envolvidas na organificação do iodeto poderiam fornecer a base molecular para o HC por DOI, já que a atividade enzimática da TPO é altamente dependente de níveis adequados de iodo e H_2O_2 (35). Song e cols. também propuseram que as proteínas DUOX2 e TPO poderiam interagir para aumentar a eficiência na funcionalidade do sistema de organificação do iodeto, outro mecanismo que poderia explicar alguns casos de HC por DOI (61).

6 CONCLUSÃO

Ao final deste estudo, concluímos que:

1. Identificamos no gene *DUOX2* 20 polimorfismos previamente descritos, sendo o p.H678R funcional, e a nova alteração p.A1087V; no gene *DUOX2* identificamos 5 polimorfismos previamente descritos e nenhuma mutação;
2. A alteração p.R584Q na TPO mostrou-se deletéria, com perda de cerca de 95% de função da proteína.

7 ANEXOS

7.1 Anexo A

Tabela 10: Mutações descritas nos genes *TPO*, *DUOX2* e *DUOXA2* segundo *The Human Gene Mutation Database - Public* (<http://www.hgmd.cf.ac.uk> em 12/09/2014)

Gene	Exon	cDNA	Proteína	ID	Ref
TPO	2	c.31_50dup	p.Glu17AspfsTer77	CI941923	(79)
TPO	3	c.157G>C	p.Ala53Pro	CM022257	(80)
TPO	4	c.215delA	p.Gln72ArgfsTer15	CD073714	(55)
TPO	4	c.349G>C	p.Asp117His	CS002686	(52)
TPO	5	c.387delC	p.Asn129LysfsTer80	CD032501	(81)
TPO	5	c.391T>C	p.Ser131Pro	CM053431	(75)
TPO	5	c.477delC	p.Asn159LysfsTer14	CD056476	(82)
TPO	6	c.524G>A	p.Arg175Gln	CM043875	(56)
TPO	6	c.523C>T	p.Arg175Ter	CM076569	(83)
TPO	7	c.703C>T	p.Gln235Ter	CM063220	(84)
TPO	7	c.718G>A	p.Asp240Asn	CM994142	(85)
TPO	8	c.843delC	p.Ala281ArgfsTer36	CD022574	(53)
TPO	8	c.875C>T	p.Ser292Phe	CM072093	(86)
TPO	8	c.920A>C	p.Asn307Thr	CM032387	(81)
TPO	8	c.940C>T	p.Arg314Trp	CM087638	(87)
TPO	8	c.943C>T	p.Gln315Ter	HM090020	(88)
TPO	8	c.955G>A	p.Gly319Arg	CM0910001	(89)
TPO	8	c.976G>A	p.Ala326Thr	CM002642	(52)
TPO	8	c.1132G>A	p.Glu378Lys	CM056709	(90)
TPO	8	c.1152G>T	p.Glu384Asp	CM035086	(50)
TPO	8	c.1159G>A	p.Gly387Arg	CM073389	(55)
TPO	8	c.1183_1186dup	p.Ala397ProfsTer76	CI920956	(91)
TPO	8	c.1274A>G	p.Asn425Ser	CM053429	(75)
TPO	8	c.1297G>A	p.Val433Met	CM032388	(81)
TPO	8	c.1336delC	p.Gln446ArgfsTer5	CD002723	(52)
TPO	8	c.1338G>C	p.Gln446His	CM091116	(92)
TPO	8	c.1338+1A>T		CS971915	(93)
TPO	9	c.1339A>T	p.Ile447Phe	CM002643	(52)
TPO	9	c.1357T>G	p.Tyr453Asp	CM951240	(94)

Tabela 10: Mutações descritas nos genes *TPO*, *DUOX2* e *DUOXA2* segundo *The Humam Gene Mutation Database - Public* (<http://www.hgmd.cf.ac.uk> em 12/09/2014) (Continuação)

Gene	Exon	cDNA	Proteína	ID	Ref
TPO	9	c.1373T>C	p.Leu458Pro	CM014117	(95)
TPO	9	c.1430_1450del	p.Ala477_Asn483del	CG077124	(56)
TPO	9	c.1472G>A	p.Arg491His	CM014118	(95)
TPO	9	c.1477G>A	p.Gly493Ser	CM022475	(53)
TPO	9	c.1496C>T	p.Pro499Leu	CM032389	(81)
TPO	9	c.1496delC	p.Pro499ArgfsTer3	CD080915	(9)
TPO	9	c.1581G>T	p.Trp527Cys	CM002644	(52)
TPO	9	c.1597G>T	p.Gly533Cys	CM034302	(96)
TPO	9	c.1597+1G>T		CS035098	(50)
TPO	10	c.1618C>T	p.Arg540Ter	CM951241	(94)
TPO	10	c.1690C>A	p.Leu564Ile	CM035087	(50)
TPO	10	c.1718_1723del	p.Asp574_Leu575del	CD034356	(96)
TPO	10	c.1768G>A	p.Gly590Ser	CS951539	(94)
TPO	10	c.1768+1G>A		CS002687	(52)
TPO	11	c.1943G>A	p.Arg648Gln	CM991194	(97)
TPO	11	c.1955dupT	p.Phe653ValfsTer16	CI080981	(9)
TPO	11	c.1978C>G	p.Gln660Glu	CM991195	(76)
TPO	11	c.1993C>T	p.Arg665Trp	CM022072	(50)
TPO	11	c.1994G>A	p.Arg665Gln	CM035088	(98)
TPO	11	c.1999G>A	p.Gly667Ser	CM076571	(56)
TPO	12	c.2059G>T	p.Glu687Ter	CM024370	(99)
TPO	12	c.2077C>T	p.Arg693Trp	CM002645	(52)
TPO	12	c.2153_2154del	p.Phe718Ter	CD002724	(52)
TPO	13	c.2243delT	p.Val748GlyfsTer50	CD022294	(80)
TPO	13	c.2268dupT	p.Glu757Ter	CI022301	(80)
TPO	13	c.2311G>A	p.Gly771Arg	CM022073	(98)
TPO	13	c.2386G>T	p.Asp796Tyr	CS022506	(53)
TPO	14	c.2395G>A	p.Glu799Lys	CM951242	(94)
TPO	14	c.2398C>T	p.Cys800Arg	CM056710	(100)
TPO	14	c.2413delC	p.His805ThrfsTer27	CD022575	(53)
TPO	14	c.2421dupC	p.Cys808LeufsTer72	CI951980	(94)
TPO	14	c.2422delT	p.Cys808AlafsTer24	CD002725	(52)
TPO	14	c.2422T>C	p.Cys808Arg	CM032390	(81)
TPO	14	c.2512T>A	p.Cys838Ser	CM053430	(75)
TPO	14	c.2515G>A	p.Val839Ile	CM024371	(99)

Tabela 10: Mutações descritas nos genes *TPO*, *DUOX2* e *DUOXA2* segundo *The Humam Gene Mutation Database - Public* (<http://www.hgmd.cf.ac.uk> em 12/09/2014) (Conclusão)

Gene	Exon	cDNA	Proteína	ID	Ref
TPO	15	c.2578G>A	p.Gly860Arg	CM076570	(56)
TPO	15	c.2619G>A	p.Trp873Ter	CM091117	(92)
TPO	16	c.2619-6_2622del		CD056859	(90)
TPO	16	c.2647C>T	p.Pro883Ser	CM044949	(83)
TPO	16	c.2722_2731del	p.Arg908LeufsTer63	CD062240	(84)
TPO	16	c.2748G>A	p.Gln916Gln	CS053498	(75)
DUOX2	3	c.108G>C	p.Gln36His	CM060251	(101)
DUOX2	6	c.602dupG	p.Gly201fsTer99	CI066425	(102)
DUOX2	10	c.1126C>T	p.Arg376Trp	CM053838	(103)
DUOX2	12	c.1253delG	p.Gly418fsTer64	CD060597	(101)
DUOX2	12	c.1300C>T	p.Arg434Ter	CM021260	(104)
DUOX2	13	c.1435_1440delinsAG	p.Leu479SerfsTer2	CX084970	(105)
DUOX2	13	c.1516G>A	p.Asp506Asn	CM066051	(102)
DUOX2	14	c.1588A>T	p.Lys530Ter	CM085369	(105)
DUOX2	16	c.1883delA	p.Lys628ArgfsTer10	CD084971	(105)
DUOX2	17	c.1946C>A	p.Ala649Glu	CM085370	(105)
DUOX2	17	c.2033A>G	p.His678Arg	CM085365	(105)
DUOX2	17	c.2056C>T	p.Gln686Ter	CM021261	(104)
DUOX2	17	c.2101C>T	p.Arg701Ter	CM021262	(104)
DUOX2	19	c.2523C>T	p.Arg842XTer	CM053837	(103)
DUOX2	19	c.2561-2A>C		CS060527	(101)
DUOX2	20	c.2635G>A	p.Glu879Lys	CM085368	(105)
DUOX2	20	c.2654G>A	p.Arg885Gln	CM085366	(105)
DUOX2	21	c.2732C>T	p.Ser911Leu	CM097376	(106)
DUOX2	22	c.2895_2898del	p.Ser965fsTer29	CD021412	(104)
DUOX2	24	c.3076C>T	p.Gln1026Ter	CM068182	(107)
DUOX2	24	c.3155G>A	p.Cys1052Tyr	CM097377	(106)
DUOX2	25	c.3200T>C	p.Leu1067Ser	CM085371	(105)
DUOX2	25	c.3329G>A	p.Arg1110Gln	CM085367	(108)
DUOX2	34	c.4552G>A	p.Gly1518Ser	CM102275	(109)
DUOX2	26-34	c.3516-?_4647+?del		CG102276	(109)
DUOXA2	5	c.738C>G	p.Tyr246Ter	CM080218	(59)

7.2 Anexo B

Tabela 11: Dados clínicos, laboratoriais e moleculares dos pacientes com DOI estudados

Paciente	TSH neo (ng/dL)	TSH (ng/dL)	TG (ng/dL)	T4L (ng/dL)	US	Capt ¹³¹ I		Teste NaClO ₄ (queda)	Audio metria	Análise molecular
						2h	24h			
I 4,9 anos F	35,0	29,0	103,0	1,1	NL	21,0	51,0	NR	NR	SM
II 3,2 anos M	89,0	41,0	69,6	1,1	NL	16,0	25,0	47,4%	NL	DUOX2 p. [A1087V]; [?]
III 10,3 anos M	51,0	107,0	287,0	0,4	BO	38,0	34,0	67,5%	NL	TPO p. [R584Q]; [Q660E] DUOX2 p. [H678R]; [?]
IV 3,4 anos F	43,0	39,2	1,6	1,0	NL	18,0	21,0	47,3%	NL	SM
V 9,8 anos M	51,0	10,0	70,2	1,1	NL	18,0	34,0	21,2%	NL	TPO p. [Q660E]; [?] DUOX2 p. [H678R]; [?]
VI 4,7 anos F	286,0	182,0	250,0	<0,3	NL	23,0	14,0	85,7%	NR	TPO p. [R584Q] DUOX2 p. [H678R]; [?]
VII 3,3 anos M	12,5	8,5	89,0	1,0	NL	14,0	17,0	47,3%	NR	SM

M: masculino; F: feminino; neo: neonatal; US: ultrassonografia; NL: normal; BO: bócio; Capt: captação; NR: não realizou; SM: sem mutação.

7.3 Anexo C

Tabela 12: Sequência dos *primers* utilizados para as reações de amplificação, sequenciamento, mutagênese e quantificação neste trabalho

<i>Primers</i>	Sequencia sense (5' → 3')	Sequencia antisense (5' → 3')	pb
<i>DUOX2</i> exon 1	tggcgtttggatgaaggt	agggatcctggggaacac	300
<i>DUOX2</i> exon 2	gtagctgggagcgtagtgt	gtgtccccgcagattcc	226
<i>DUOX2</i> exon 3	aggcttagggagaggtttgg	cagatcaacccactggtct	274
<i>DUOX2</i> exon 4	tacggacggtttgtcacg	cgcctctcccctccag	317
<i>DUOX2</i> exon 5	ctcgaccggggtcac	gtggcctcaccgtacagc	246
<i>DUOX2</i> exon 6	cagaacccctgtcatgt	gagtctcccgtgggcttg	401
<i>DUOX2</i> exons 7 e 8	gggctcagacccttcag	gcagctcattctgcacctt	409
<i>DUOX2</i> exons 9 e 10	actgagtcctcagccact	gcttctgggtcccttaccat	582
<i>DUOX2</i> exon 11	gtagccaggagggaagaa	tgtcatcagtaaaatggggaaa	414
<i>DUOX2</i> exon 12	gagggatggggcaacagt	aggctgaggagcagtctgag	291
<i>DUOX2</i> exon 13	cttccatcccagtgacttc	gcacctcaatcttgatcct	220
<i>DUOX2</i> exons 14 e 15	aagaggtctggccacatagc	tttcccagactcctgtctctc	570
<i>DUOX2</i> exon 16	ctggggacatctgctgaact	gtggcctcgttgtgataat	317
<i>DUOX2</i> exon 17	caaccaagatccattgagg	ttctatgcagcccaggttc	336
<i>DUOX2</i> exons 18 e 19	gcttcagcataggttcac	ctggacctgtttcctgtttg	531
<i>DUOX2</i> exon 20	acctaccaagcctgacctt	cccaccaggaactctcattt	325
<i>DUOX2</i> exon 21	ggaagccagctcctgctctt	gccagtcctactcccttcatt	178
<i>DUOX2</i> exon 22	gttctctggctgcaaagac	gatatgtgggtggggccta	213
<i>DUOX2</i> exon 23	atggagtggcattaagggaag	tcttaggatcagagggtttcc	329
<i>DUOX2</i> exon 24	cctgtgccaagctgatgtaa	gctgcagcaaagaggaagaa	305
<i>DUOX2</i> exon 25	agtctgtctggttggeatc	cacctatgagtcccaggag	184
<i>DUOX2</i> exon 26	gctggagcccctct	gacccatggccagtataga	198
<i>DUOX2</i> exons 27 e 28	cccaagctgaagtctgaga	tgaagattggcctctgtcg	606
<i>DUOX2</i> exon 29	gagcacgccttctcatctgt	atagggaagggcagagatcc	345
<i>DUOX2</i> exon 30	cagggtcaggctcatttc	gtcacaattcgccacctat	251
<i>DUOX2</i> exons 31 e 32	gaactgagctgggtcctgat	gcaggagaaggccagagtc	614
<i>DUOX2</i> exon 33	aggctcaggaagcagctttt	gcacagaagagaaggcagga	253
<i>DUOX2</i> exon 1	taacggagaggtgcaggact	ctccacctgagcctcaattc	428
<i>DUOX2</i> exon 2	gaaagtgcgtggtcacaaaa	ccaatgtggttgcattggtaa	408
<i>DUOX2</i> exon 3	tccttctagggccactttt	aaatccacgaggaccacaag	410
<i>DUOX2</i> exon 4	acacccccacttctctgtct	gtctgtgcagatctcgtgga	467

Tabela 12: Sequência dos *primers* utilizados para as reações de amplificação, sequenciamento, mutagênese e quantificação neste trabalho (Conclusão)

<i>Primers</i>	Sequencia sense (5' → 3')	Sequencia antisense (5' → 3')	pb
<i>DUOX2</i> exon 5	acgctggggtaggataaag	attgagaggggcaaataagg	426
<i>DUOX2</i> exon 6	atgccctcctttcttcgat	gcggagaagccatgaaaat	459
Mutagênese TPO	gcagagggggccaggaccagggc	gcccgtggtcctggcccctctgc	
Amplificação pTPO	ctgtccaattccagcacctt	catcgatgtgtcaggatgc	202
qPCR TPO	acagttctccacggatgcacta	ggcaagcatcctgacaggtt	

7.4 Anexo D**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL****NOME DO PACIENTE:**

Documento de identidade nº: Sexo: M () F ()

Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: Nº: Apto:

Bairro: Cidade:

CEP: Telefone: DDD (.....).....

RESPONSÁVEL LEGAL:

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):

Documento de identidade nº: Sexo: M () F ()

Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: Nº: Apto:

Bairro: Cidade:

CEP: Telefone: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA**1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:** Análise molecular de pacientes com hipotireoidismo congênito por defeito na organificação do iodeto**2. PESQUISADOR:** Dra Suemi Marui

CARGO/FUNÇÃO: Médica-assistente INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: 70248

UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Endocrinologia e Metabologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISARISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐RISCO BAIXO ☒ RISCO MAIOR ☐**4. DURAÇÃO DA PESQUISA:** 12 meses

1. Desenho do estudo e objetivo(s) da pesquisa: você ou seu filho apresentam um hipotireoidismo por uma deficiência na produção dos hormônios da tireoide que apareceu desde o nascimento. Essa deficiência é causada por alteração em uma enzima produzida na tireoide. Com essa pesquisa, conseguiremos saber qual seria essa alteração e comparar com os exames já feitos no diagnóstico. Como a causa é genética, ou seja, você ou seu filho nasceu com esse problema, seria importante saber se é de família ou só aconteceu com uma única vez.
2. Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: Você e seu filho vão colher exame de sangue para o teste genético, para identificar se existe alguma “letra” diferente nesta enzima do que seria esperado e se isso é a causa do hipotireoidismo.
3. Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: não há.
4. Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: apenas o desconforto de uma picada. Pode ficar um pouco roxo no lugar e dolorido, que passa em algumas horas.
5. Benefícios para o participante: com estes testes, poderemos tentar encontrar a causa do hipotireoidismo do seu filho, dar o melhor tratamento e também aconselhar a família sobre o risco de ter outro filho com a mesma doença. O material doado poderá ser útil em pesquisas futuras, mesmo que não encontremos nada na pesquisa atual, pois podem aparecer técnicas novas de estudo ou mesmo genes novos a serem estudados. O material doado poderá ficar armazenado por até 10 anos. Depois deste tempo, ele certamente será descartado.
6. Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: não há.
7. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra Suemi Marui, que pode ser encontrada no endereço Avenida Dr. Enéias de Carvalho Aguiar, 255 - Prédio dos Ambulatórios, 2º andar sala 7 - telefone 2661-6123. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), Rua Ovídio Pires de Campos, 255 - 5º andar - telefone 2661-6442 ramais 16,17,18 ou 20, FAX 2661-6442 ramal 26 - email: cappesq@hcnet.usp.br.
8. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.
9. Direito de confidencialidade: as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

10. Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento de pesquisadores
11. Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas.
12. Compromisso do pesquisados em utilizar os dados e o material coletado para a realização de pesquisas futuras. No caso de outras pesquisas usando este material doado, há necessidade de contata-lo para obter novas autorizações?

() Não, eu dispenso essas novas autorizações, pois estou ciente e de acordo que cada nova pesquisa será analisada pela Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP que autorizará ou não a utilização do material biológico que foi por mim doado.

() Sim, no caso de novas pesquisas, eu quero ser contatado para autorizar ou não a utilização do material biológico que foi por mim doado.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Análise molecular de pacientes com hipotireoidismo congênito por defeito na organificação do iodeto”.

Eu discuti com a Dra Suemi Marui sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente a participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

Para casos de pacientes menos de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

7.5 Anexo E

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

PROJETO DE PESQUISA

Título: Análise molecular de pacientes com hipotireoidismo congênito por defeito na organificação do iodo

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 01696312.3.0000.0068

Pesquisador: SUEMI MARUI

Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 92.909

Data da Relatoria: 05/09/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo prospectivo para análise de mutações em genes relacionados ao hipotireoidismo congênito por disormonogênese.

Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa tem por objetivo realizar o estudo funcional da mutação p.R548Q identificada no gene TPO em pacientes brasileiros e pesquisar a mutação do gene DUOX2 em pacientes com suspeita de defeito na organificação do iodo, sem mutação no gene TPO

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos (coleta de sangue) e não há implicações éticas imediatas. O melhor entendimento da doença (descoberta da causa do hipotireoidismo) pode ser considerado um benefício ao paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa inovadora, inserida em linha de pesquisa bem estabelecida no grupo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O termo de Consentimento foi atualizado

Recomendações:**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Considerações atendidas, não há impedimento para sua execução

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010

UF: SP Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-6442 Fax: (11)2661-6442

E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 10 de Setembro de 2012

Assinado por:
Luiz Eugênio Garcez Leme

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-6442 Fax: (11)2661-6442 E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

8 REFERÊNCIAS

1. Maciel RMB. Tireoide: fisiologia e avaliação diagnóstica. *Endocrinologia*. 1. São Paulo: Ed. Atheneu; 2007. p. 299-329.
2. De Felice M, Di Lauro R. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr Rev*. 2004;25(5):722-46.
3. Pardo VLdVd. Rastreamento e estudo funcional de mutações do gene da tireoglobulina associadas a bócio congênito e hipotireoidismo. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.
4. Wolff J, Chaikoff IL. Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. *J Biol Chem*. 1948;174(2):555-64.
5. Simpser T, Rapaport R. Update on some aspects of neonatal thyroid disease. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2010;2(3):95-9.
6. Setian NS. Hypothyroidism in children: diagnosis and treatment. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83(5 Supl):S209-16.
7. Porterfield SP, Hendrich CE. The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development--current perspectives. *Endocr Rev*. 1993;14(1):94-106.
8. Loeber JG. Neonatal screening in Europe; the situation in 2004. *J Inherit Metab Dis*. 2007;30(4):430-8.
9. Deladoëy J, Pfarr N, Vuissoz JM, Parma J, Vassart G, Biesterfeld S, et al. Pseudodominant inheritance of goitrous congenital hypothyroidism caused by TPO mutations: molecular and in silico studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(2):627-33.
10. Corbetta C, Weber G, Cortinovis F, Calebiro D, Passoni A, Vigone MC, et al. 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):739-45.
11. Nunes AK, Wachholz RG, Rover MR, Souza LC. [Prevalence of disorders detected by newborn screening in Santa Catarina]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2013;57(5):360-7.
12. Mendes LC, Santos TT, Bringel FeA. [Evolution of the neonatal screening program in the state of Tocantins]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2013;57(2):112-9.
13. Chiesa A, Prieto L, Mendez V, Papendieck P, Calcagno MeL, Gruñeiro-Papendieck L. Prevalence and etiology of congenital hypothyroidism detected

- through an argentine neonatal screening program (1997-2010). *Horm Res Paediatr*. 2013;80(3):185-92.
14. Shi XT, Cai J, Wang YY, Tu WJ, Wang WP, Gong LM, et al. Newborn screening for inborn errors of metabolism in mainland china: 30 years of experience. *JIMD Rep*. 2012;6:79-83.
 15. Bekhit OE, Yousef RM. Permanent and transient congenital hypothyroidism in Fayoum, Egypt: a descriptive retrospective study. *PLoS One*. 2013;8(6):e68048.
 16. Juan-Fita MJ, Egea-Mellado JM, González-Gallego I, Moya-Quiles MR, Fernández-Sánchez A. [Expanded newborn screening in the Region of Murcia, Spain. Three-years experience]. *Med Clin (Barc)*. 2012;139(13):566-71.
 17. Feuchtbaum L, Carter J, Dowray S, Currier RJ, Lorey F. Birth prevalence of disorders detectable through newborn screening by race/ethnicity. *Genet Med*. 2012;14(11):937-45.
 18. Kaur G, Srivastav J, Jain S, Chawla D, Chavan BS, Atwal R, et al. Preliminary report on neonatal screening for congenital hypothyroidism, congenital adrenal hyperplasia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a Chandigarh experience. *Indian J Pediatr*. 2010;77(9):969-73.
 19. Zeinalzadeh AH, Talebi M. Neonatal screening for congenital hypothyroidism in East Azerbaijan, Iran: the first report. *J Med Screen*. 2012;19(3):123-6.
 20. Haghshenas M, Zahed Pasha Y, Ahmadpour-Kacho M, Ghazanfari S. Prevalence of permanent and transient congenital hypothyroidism in Babol City -Iran. *Med Glas (Zenica)*. 2012;9(2):341-4.
 21. Karamizadeh Z, Saneifard H, Amirhakimi G, Karamifar H, Alavi M. Evaluation of congenital hypothyroidism in fars province, iran. *Iran J Pediatr*. 2012;22(1):107-12.
 22. Dalili S, Mohtasham-Amiri Z, Rezvani SM, Dadashi A, Medghalchi A, Hoseini S, et al. The prevalence of iodine deficiency disorder in two different populations in northern province of Iran: a comparison using different indicators recommended by WHO. *Acta Med Iran*. 2012;50(12):822-6.
 23. Hashemipour M, Ghasemi M, Hovsepian S, Heiydari K, Sajadi A, Hadian R, et al. Prevalence of permanent congenital hypothyroidism in isfahan-iran. *Int J Prev Med*. 2013;4(12):1365-70.
 24. Sutivijit Y, Banpavichit A, Wiwanitkit V. Prevalence of neonatal hypothyroidism and phenylketonuria in Southern Thailand: A 10-year report. *Indian J Endocrinol Metab*. 2011;15(2):115-7.
 25. Palhares HM, Silva LC, Sato LM, Lara BH, Miranzi SeS, Silva AeP, et al. Incidence of congenital hypothyroidism in the city of Uberaba/Minas Gerais and

- etiological evaluation of the affected subjects. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2012;56(5):305-12.
26. Setian N. Tireóide. In: Setian, editor. *Endocrinologia Pediátrica: aspectos físicos e metabólicos do recém-nascido ao adolescente* São Paulo: Sarvier; 2002.
 27. Ramos HE, Nesi-França S, Maciel RM. [New aspects of genetics and molecular mechanisms on thyroid morphogenesis for the understanding of thyroid dysgenesis]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(9):1403-15.
 28. De Felice M, Di Lauro R. Minireview: Intrinsic and extrinsic factors in thyroid gland development: an update. *Endocrinology.* 2011;152(8):2948-56.
 29. de Vijlder JJ, Ris-Stalpers C, Vulsma T. Inborn errors of thyroid hormone biosynthesis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1997;105 Suppl 4:32-7.
 30. Beltrão CB, Juliano AG, Chammas MC, Watanabe T, Sapienza MT, Marui S. Etiology of congenital hypothyroidism using thyroglobulin and ultrasound combination. *Endocr J.* 2010;57(7):587-93.
 31. Ramos JC, de Lacerda Filho L, Demartini AeA, da Silveira RB, Pereira RM, Sandrini Neto R, et al. Clinical and laboratory features of children and adolescents with congenital hypothyroidism due to dysharmonogenesis in southern Brazil. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2012;56(3):201-8.
 32. Spitzweg C, Morris JC. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to NIS mutations. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;322(1-2):56-63.
 33. Bizhanova A, Kopp P. Genetics and phenomics of Pendred syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;322(1-2):83-90.
 34. Grasberger H. Defects of thyroidal hydrogen peroxide generation in congenital hypothyroidism. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;322(1-2):99-106.
 35. 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.
 36. Targovnik HM, Esperante SA, Rivolta CM. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to thyroglobulin mutations. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;322(1-2):44-55.
 37. Moreno JC, Visser TJ. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to iodotyrosine deiodinase (DEHAL1) gene mutations. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;322(1-2):91-8.
 38. Cavarzere P, Castanet M, Polak M, Raux-Demay MC, Cabrol S, Carel JC, et al. Clinical description of infants with congenital hypothyroidism and iodide organification defects. *Horm Res.* 2008;70(4):240-8.

-
39. Belforte FS, Miras MB, Olcese MC, Sobrero G, Testa G, Muñoz L, et al. Congenital goitrous hypothyroidism: mutation analysis in the thyroid peroxidase gene. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;76(4):568-76.
 40. Knobel M, Medeiros-Neto G. An outline of inherited disorders of the thyroid hormone generating system. *Thyroid*. 2003;13(8):771-801.
 41. Park SM, Chatterjee VK. Genetics of congenital hypothyroidism. *J Med Genet*. 2005;42(5):379-89.
 42. Kimura S, Kotani T, McBride OW, Umeki K, Hirai K, Nakayama T, et al. Human thyroid peroxidase: complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping, and identification of two alternately spliced mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(16):5555-9.
 43. Penel C, Gruffat D, Alquier C, Benoliel AM, Chabaud O. Thyrotropin chronically regulates the pool of thyroperoxidase and its intracellular distribution: a quantitative confocal microscopic study. *J Cell Physiol*. 1998;174(2):160-9.
 44. Esposito C, Miccadei S, Saiardi A, Civitareale D. PAX 8 activates the enhancer of the human thyroperoxidase gene. *Biochem J*. 1998;331 (Pt 1):37-40.
 45. 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 multisplliced mRNAs. *J Biol Chem*. 2003;278(6):3793-800.
 46. Niepomniszcze H, Medeiros-Neto GA, Refetoff S, Degroot LJ, Fang VS. Familial goitre with partial iodine organification defect, lack of thyroglobulin, and high levels of thyroid peroxidase. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1977;6(1):27-39.
 47. Ruf J, Carayon P. Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2006;445(2):269-77.
 48. Taurog A, Dorris ML. Peroxidase-catalyzed bromination of tyrosine, thyroglobulin, and bovine serum albumin: comparison of thyroid peroxidase and lactoperoxidase. *Arch Biochem Biophys*. 1991;287(2):288-96.
 49. Kuliawat R, Ramos-Castañeda J, Liu Y, Arvan P. Intracellular trafficking of thyroid peroxidase to the cell surface. *J Biol Chem*. 2005;280(30):27713-8.
 50. Nascimento AC, Guedes DR, Santos CS, Knobel M, Rubio IG, Medeiros-Neto G. Thyroperoxidase gene mutations in congenital goitrous hypothyroidism with total and partial iodide organification defect. *Thyroid*. 2003;13(12):1145-51.
 51. Neves SC, Mezalira PR, Dias VM, Chagas AJ, Viana M, Targovnik H, et al. Monoallelic thyroid peroxidase gene mutation in a patient with congenital hypothyroidism with total iodide organification defect. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2010;54(8):732-7.

-
52. Bakker B, Bikker H, Vulsma T, de Randamie JS, Wiedijk BM, De Vijlder JJ. Two decades of screening for congenital hypothyroidism in The Netherlands: TPO gene mutations in total iodide organification defects (an update). *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(10):3708-12.
 53. Wu JY, Shu SG, Yang CF, Lee CC, Tsai FJ. Mutation analysis of thyroid peroxidase gene in Chinese patients with total iodide organification defect: identification of five novel mutations. *J Endocrinol.* 2002;172(3):627-35.
 54. Fugazzola L, Cerutti N, Mannavola D, Vannucchi G, Fallini C, Persani L, et al. Monoallelic expression of mutant thyroid peroxidase allele causing total iodide organification defect. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(7):3264-71.
 55. Rivolta CM, Louis-Tisserand M, Varela V, Gruñeiro-Papendieck L, Chiesa A, González-Sarmiento R, et al. Two compound heterozygous mutations (c.215delA/c.2422T-->C and c.387delC/c.1159G-->A) in the thyroid peroxidase gene responsible for congenital goitre and iodide organification defect. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;67(2):238-46.
 56. Avbelj M, Tahirovic H, Debeljak M, Kusekova M, Toromanovic A, Krzisnik C, et al. High prevalence of thyroid peroxidase gene mutations in patients with thyroid dyshormonogenesis. *Eur J Endocrinol.* 2007;156(5):511-9.
 57. Gimelbrant A, Hutchinson JN, Thompson BR, Chess A. Widespread monoallelic expression on human autosomes. *Science.* 2007;318(5853):1136-40.
 58. Luxen S, Belinsky SA, Knaus UG. Silencing of DUOX NADPH oxidases by promoter hypermethylation in lung cancer. *Cancer Res.* 2008;68(4):1037-45.
 59. Zamproni I, Grasberger H, Cortinovis F, Vigone MC, Chiumello G, Mora S, et al. Biallelic inactivation of the dual oxidase maturation factor 2 (DUOXA2) gene as a novel cause of congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(2):605-10.
 60. Kopp P. Thyroid hormone synthesis. In: Braverman L, Cooper D, editors. *Werner & Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text.* 10th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 48-74.
 61. Song Y, Ruf J, Lothaire P, Dequanter D, Andry G, Willemse E, et al. Association of duoxes with thyroid peroxidase and its regulation in thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(1):375-82.
 62. Raad H, Eskalli Z, Corvilain B, Miot F, De Deken X. Thyroid hydrogen peroxide production is enhanced by the Th2 cytokines, IL-4 and IL-13, through increased expression of the dual oxidase 2 and its maturation factor DUOXA2. *Free Radic Biol Med.* 2012.

-
63. De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, et al. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem*. 2000;275(30):23227-33.
 64. Muzza M, Rabbiosi S, Vigone M, Zamproni I, Cirello V, Maffini M, et al. The clinical and molecular characterization of patients with dysghormonogenic congenital hypothyroidism reveals specific diagnostic clues for DUOX2 defects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;jc20133618.
 65. Edens WA, Sharling L, Cheng G, Shapira R, Kinkade JM, Lee T, et al. Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/oxidoreductase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J Cell Biol*. 2001;154(4):879-91.
 66. Geiszt M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K, Leto TL. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J*. 2003;17(11):1502-4.
 67. Schwarzer C, Machen TE, Illek B, Fischer H. NADPH oxidase-dependent acid production in airway epithelial cells. *J Biol Chem*. 2004;279(35):36454-61.
 68. El Hassani RA, Benfares N, Caillou B, Talbot M, Sabourin JC, Belotte V, et al. Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(5):G933-42.
 69. Narumi S, Muroya K, Asakura Y, Aachi M, Hasegawa T. Molecular basis of thyroid dysghormonogenesis: genetic screening in population-based Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(11):E1838-42.
 70. Grasberger H, De Deken X, Mayo OB, Raad H, Weiss M, Liao XH, et al. Mice deficient in dual oxidase maturation factors are severely hypothyroid. *Mol Endocrinol*. 2012;26(3):481-92.
 71. Grasberger H, Refetoff S. Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent. *J Biol Chem*. 2006;281(27):18269-72.
 72. Beltrão CB. Contribuição da dosagem de tireoglobulina e de exames de imagem para o diagnóstico de hipotireoidismo congênito: pesquisa dos genes PAX8 e receptor do TSH na disgenesia tireoidiana. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.
 73. Brust ES, Beltrao CB, Chammas MC, Watanabe T, Sapienza MT, Marui S. Absence of mutations in PAX8, NKX2.5, and TSH receptor genes in patients with thyroid dysgenesis. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2012;56(3):173-7.
 74. Pardo V, Rubio IG, Knobel M, Aguiar-Oliveira MH, Santos MM, Gomes SA, et al. Phenotypic variation among four family members with congenital hypothyroidism caused by two distinct thyroglobulin gene mutations. *Thyroid*. 2008;18(7):783-6.

-
75. Rodrigues C, Jorge P, Soares JP, Santos I, Salomão R, Madeira M, et al. Mutation screening of the thyroid peroxidase gene in a cohort of 55 Portuguese patients with congenital hypothyroidism. *Eur J Endocrinol*. 2005;152(2):193-8.
 76. Santos CL, Bikker H, Rego KG, Nascimento AC, Tambascia M, De Vijlder JJ, et al. A novel mutation in the TPO gene in goitrous hypothyroid patients with iodide organification defect. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999;51(2):165-72.
 77. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
 78. De Marco G, Agretti P, Montanelli L, Di Cosmo C, Bagattini B, De Servi M, et al. Identification and Functional Analysis of Novel Dual Oxidase 2 (DUOX2) Mutations in Children with Congenital or Subclinical Hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(8):E1335-E9.
 79. Bikker H, den Hartog MT, Baas F, Gons MH, Vulsma T, de Vijlder JJ. A 20-basepair duplication in the human thyroid peroxidase gene results in a total iodide organification defect and congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79(1):248-52.
 80. Niu DM, Hwang B, Chu YK, Liao CJ, Wang PL, Lin CY. High prevalence of a novel mutation (2268 insT) of the thyroid peroxidase gene in Taiwanese patients with total iodide organification defect, and evidence for a founder effect. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(9):4208-12.
 81. Rivolta CM, Esperante SA, Gruñeiro-Papendieck L, Chiesa A, Moya CM, Domené S, et al. Five novel inactivating mutations in the thyroid peroxidase gene responsible for congenital goiter and iodide organification defect. *Hum Mutat*. 2003;22(3):259.
 82. Fugazzola L, Mannavola D, Vigone MC, Cirello V, Weber G, Beck-Peccoz P, et al. Total iodide organification defect: clinical and molecular characterization of an Italian family. *Thyroid*. 2005;15(9):1085-8.
 83. 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.
 84. Pfarr N, Borck G, Turk A, Napiontek U, Keilmann A, Müller-Forell W, et al. Goitrous congenital hypothyroidism and hearing impairment associated with mutations in the TPO and SLC26A4/PDS genes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(7):2678-81.
 85. Kotani T, Umeki K, Yamamoto I, Maesaka H, Tachibana K, Ohtaki S. A novel mutation in the human thyroid peroxidase gene resulting in a total iodide organification defect. *J Endocrinol*. 1999;160(2):267-73.

-
86. Tenenbaum-Rakover Y, Mamanasiri S, Ris-Stalpers C, German A, Sack J, Allon-Shalev S, et al. 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.
 87. 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):1093-7.
 88. 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.
 89. Ozbek M, Uslu A, Onenli-Mungan N, Yuksel B, Pohlenz J, Topaloglu A. Thyroid peroxidase gene mutations causing congenital hypothyroidism in three Turkish families. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2009;22(11):1033-9.
 90. Tajima T, Tsubaki J, Fujieda K. Two novel mutations in the thyroid peroxidase gene with goitrous hypothyroidism. *Endocr J*. 2005;52(5):643-5.
 91. Abramowicz MJ, Targovnik HM, Varela V, Cochaux P, Krawiec L, Pisarev MA, et al. Identification of a mutation in the coding sequence of the human thyroid peroxidase gene causing congenital goiter. *J Clin Invest*. 1992;90(4):1200-4.
 92. 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):1057-61.
 93. Bikker H, Baas F, De Vijlder JJ. Molecular analysis of mutated thyroid peroxidase detected in patients with total iodide organification defects. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(2):649-53.
 94. Bikker H, Vulsma T, Baas F, de Vijlder JJ. Identification of five novel inactivating mutations in the human thyroid peroxidase gene by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mutat*. 1995;6(1):9-16.
 95. Ambrugger P, Stoeva I, Biebermann H, Torresani T, Leitner C, Grüters A. Novel mutations of the thyroid peroxidase gene in patients with permanent congenital hypothyroidism. *Eur J Endocrinol*. 2001;145(1):19-24.
 96. Kotani T, Umeki K, Kawano J, Sukanuma T, Hishinuma A, Ieiri T, et al. 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.
 97. Pannain S, Weiss RE, Jackson CE, Dian D, Beck JC, Sheffield VC, et al. Two different mutations in the thyroid peroxidase gene of a large inbred Amish kindred: power and limits of homozygosity mapping. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(3):1061-71.

-
98. Umeki K, Kotani T, Kawano J, Suganuma T, Yamamoto I, Aratake Y, et al. Two novel missense mutations in the thyroid peroxidase gene, R665W and G771R, result in a localization defect and cause congenital hypothyroidism. *Eur J Endocrinol*. 2002;146(4):491-8.
 99. Calaciura F, Miscio G, Coco A, Leonardi D, Cisternino C, Regalbuto C, et al. Genetics of specific phenotypes of congenital hypothyroidism: a population-based approach. *Thyroid*. 2002;12(11):945-51.
 100. Börgel K, Pohlenz J, Holzgreve W, Bramswig JH. Intrauterine therapy of goitrous hypothyroidism in a boy with a new compound heterozygous mutation (Y453D and C800R) in the thyroid peroxidase gene. A long-term follow-up. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;193(3 Pt 1):857-8.
 101. Varela V, Rivolta CM, Esperante SA, Gruñeiro-Papendieck L, Chiesa A, Targovnik HM. Three mutations (p.Q36H, p.G418fsX482, and g.IVS19-2A>C) in the dual oxidase 2 gene responsible for congenital goiter and iodide organification defect. *Clin Chem*. 2006;52(2):182-91.
 102. Pfarr N, Korsch E, Kaspers S, Herbst A, Stach A, Zimmer C, et al. Congenital hypothyroidism caused by new mutations in the thyroid oxidase 2 (THOX2) gene. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;65(6):810-5.
 103. Vigone MC, Fugazzola L, Zamproni I, Passoni A, Di Candia S, Chiumello G, et al. Persistent mild hypothyroidism associated with novel sequence variants of the DUOX2 gene in two siblings. *Hum Mutat*. 2005;26(4):395.
 104. Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, et al. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med*. 2002;347(2):95-102.
 105. Maruo Y, Takahashi H, Soeda I, Nishikura N, Matsui K, Ota Y, et al. 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):4261-7.
 106. Tonacchera M, De Marco G, Agretti P, Montanelli L, Di Cosmo C, Freitas Ferreira AC, et al. 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):4309-14.
 107. Di Candia S, Zamproni I, Cortinovis F, Passoni A, Vigone M, Fugazzola L, et al. Congenital hypothyroidism and partial iodide organification defects: two mutations in DUOX2 gene. 45th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology; Rotterdam: Hormone Research in Pediatrics; 2006. p. 195.
 108. Ohye H, Fukata S, Hishinuma A, Kudo T, Nishihara E, Ito M, et al. A novel homozygous missense mutation of the dual oxidase 2 (DUOX2) gene in an adult patient with large goiter. *Thyroid*. 2008;18(5):561-6.

-
109. Hoste C, Rigutto S, Van Vliet G, Miot F, De Deken X. Compound heterozygosity for a novel hemizygous missense mutation and a partial deletion affecting the catalytic core of the H₂O₂-generating enzyme DUOX2 associated with transient congenital hypothyroidism. *Hum Mutat.* 2010;31(4):E1304-19.