

Denise Perone

**Avaliação do envolvimento dos genes
PAX8 e *rTSH* no hipotireoidismo congênito
em pacientes com disgenesia tireoidiana**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Endocrinologia
Orientador: Prof. Dr. Geraldo de Medeiros Neto
Co-orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Nogueira

São Paulo

2004

Denise Perone

**Avaliação do envolvimento dos genes
PAX8 e *rTSH* no hipotireoidismo congênito
em pacientes com disgenesia tireoidiana**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Endocrinologia
Orientador: Prof. Dr. Geraldo de Medeiros Neto
Co-orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Nogueira

São Paulo

2004

DEDICATÓRIA

ESTE TRABALHO SÓ PODE SER CONCLUÍDO GRAÇAS À MISERICÓRDIA DE DEUS SOBRE MINHA VIDA CONCEDENDO-ME O PRIVILÉGIO DE PODER TRABALHAR COM PESSOAS TÃO CAPACITADAS E DEDICADAS AO TRABALHO CIENTÍFICO, COMO A DRA. CÉLIA REGINA NOGUEIRA, O DR. GERALDO MEDEIROS NETO E O DR. PETER KOPP. PORTANTO, NADA MAIS JUSTO QUE DEDICAR TODO ESTE TRABALHO AO AUTOR E CONSUMADOR DA VIDA, AQUELE QUE ERA, QUE É E QUE HÁ DE VIR, JESUS CRISTO. A ELE SEJA DADO: TODA A HONRA, TODO O LOUVOR E TODA A GLÓRIA, POIS NÃO HÁ OUTRO, NO CÉU, NA TERRA E NEM DEBAIXO DA TERRA QUE SEJA DIGNO DE SER ENGRANDECIDO.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Geraldo Medeiros Neto, por ter me aceitado como sua orientanda, pela sua disposição em me ajudar e orientar nas inúmeras dificuldades desses anos de pós-graduação.

À Profa. Dra. Célia Regina Nogueira, pela sua orientação tanto profissional quanto espiritual, pela pessoa amiga e amável. Admiro sua determinação e coragem para enfrentar os obstáculos que a vida nos apresenta. Sua luz iluminou as trevas que o mundo me oferecia.

Ao Prof. Dr. Peter Kopp, pela sua orientação e humanidade, sempre presente e disposto a me ajudar. Na fase mais difícil do projeto, ele me recebeu em seu laboratório e assim pudemos concluí-lo. Com muita paciência me ensinou o que eu não sabia e dedicou parte de seu tempo na correção minuciosa desta tese.

À Profa. Dra. Maria Tereza Nunes, por ter me encorajado a viajar para Chicago para a conclusão deste projeto e pela sua participação em minha qualificação. Suas sugestões foram muito importantes e enriqueceram minha tese.

À Profa. Dra. Tânia Sanchez Bachega, pela sua participação em minha banca de qualificação. Suas sugestões e críticas foram muito valiosas para meu crescimento e contribuíram para o melhor entendimento deste manuscrito.

Ao Prof. Dr. Daniel Giannella Neto, pela sua participação em minha banca de qualificação. Suas sugestões e críticas contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

À amiga, Patrícia Pinto Saraiva, por ter me apresentado à Dra. Célia e assim começarmos a trabalhar juntas. Sua amizade me levou a iniciar este projeto. Obrigada amiga, jamais vou esquecer o que fez por mim.

À Virgínia Elias Coscrato, minha irmã em Cristo Jesus, pelas suas orações, sua amizade, dedicação e ajuda na manipulação do seqüenciador.

Ao Prof. Dr. Celso Luís Marino, por, gentilmente, nos conceder o uso do seqüenciador em seu laboratório.

Ao Dario Abel Palmieri, por nos auxiliar na manipulação do seqüenciador.

À Sueli Aparecida Clara, pela sua amizade e ajuda na manipulação do sangue dos pacientes e na extração do DNA.

A minha querida mãe, Iracema, que sempre me incentivou a continuar os estudos e que suportou a minha ausência durante os cinco meses em que estive em Chicago.

À equipe do Dr. Peter Kopp, da “Division of Endocrinology, Metabolism and Molecular Medicine, Northwestern University”, Chicago – USA, Kent Wood, Mary Gillam, Linda Chan e Lin Chen, que me receberam muito bem e, com muita paciência e amizade, muito me ajudaram nas técnicas e com o inglês.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de uma bolsa de doutorado.

À Fundação de Endocrinologia da Faculdade de Medicina – USP de São Paulo e ao Sr. David Wiener, que generosamente patrocinaram a pesquisa financiando minha viagem para Chicago e estada lá.

Ao Núcleo de Pesquisa e Apoio em Diagnóstico (NUPAD) da Universidade de Belo Horizonte – Minas Gerais, pela triagem das crianças e envio dos sangues dos pacientes com hipotireoidismo congênito devido à disgenesia tireoidiana.

Aos pacientes e seus familiares, por contribuírem para o desenvolvimento da pesquisa científica.

Agradeço a Deus por todas as pessoas maravilhosas que Ele tem colocado em minha vida. Graças a Sua bondade, pude terminar este trabalho, recebi um presente muito importante e gostaria de compartilhar com todos vocês. Espero que a minha vida traga bênçãos para as pessoas que conviveram e que convivem comigo.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.*

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

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

SUMÁRIO

Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Hipotireoidismo congênito (HC)	1
1.2 – Disgenesia tireoidiana (DT)	3
1.2.1 – Bases moleculares da disgenesia tireoidiana	3
1.2.2 – Hipoplasia tireoidiana associada a mutações no rTSH	9
2 – OBJETIVOS	11
3 – MÉTODOS	12
3.1 – Amostra	12
3.2 – Extração de DNA e análise de seqüência	13
3.2.1 – Isolamento de DNA genômico a partir de sangue periférico	14
3.2.2 – Pesquisa de mutações no gene do receptor de TSH e no gene do PAX8	14
3.3 – Genotipagem	17
3.4 – Amplificação da região promotora e exon 1 do <i>PAX8</i> para a clonagem utilizando o vetor pCRBlunt e para a subclonagem utilizando o vetor de expressão pGL3	18
3.5 – Extração dos fragmentos de DNA do gel de agarose	21
3.6 – Reação de Ligação	22
3.7 – Transformação de células TOP 10	22
3.8 – Miniprep	23
3.9 – Digestão do produto da miniprep com as enzimas <i>MluI</i> e <i>BglIII</i> para a confirmação da presença do inserto	25
3.10 – Seqüenciamento, a fim de afastar erros de incorporação foram seqüenciados os produtos nativo e mutantes	25
3.11 – Digestão do plasmídeo pGL3	26
3.12 – Reação de Ligação dos insertos, nativo e mutantes no vetor de expressão pGL3	27
3.13 – Transfecção em células FRTL-5 (Fisher Rat Thyroid Cell Line)	28
3.14 – Ensaio de Luciferase	31

3.14.1 – Preparo das soluções	31
3.14.2 – Procedimento	32
4 – RESULTADOS	33
4.1 – Seqüenciamento	33
4.2 – Genotipagem	36
4.3 – Dados clínicos dos pacientes com alterações no <i>PAX8</i>	39
4.3.1 – Paciente 1 (SPA – 128)	39
4.3.2 – Paciente 2 (SPA – 147)	40
4.4 – Resultados dos ensaios de transfecção e de atividade de transfecção	40
5 – DISCUSSÃO	43
6 – CONCLUSÕES	47
7 – FUTURAS DIREÇÕES	48
8 – ANEXOS	49
9 – REFERÊNCIAS	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Etiologia de hipotireoidismo congênito	2
Tabela 2 – Disgenesias tireoidianas e mutações em fatores de transcrição tireoidianos	5
Tabela 3 – Seqüência dos “primers” utilizados para amplificar os exons do gene <i>rTSH</i>	56
Tabela 4 – Seqüência dos “primers” utilizados para amplificar os exons do <i>PAX8</i>	57

RESUMO

Perone D. *Avaliação do envolvimento dos genes PAX8 e rTSH no hipotireoidismo congênito em pacientes com disgenesia tireoidiana* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004. 83p.

Hipotireoidismo Congênito (HC) é uma doença relativamente freqüente e potencialmente severa. O HC ocorre em 1 de 3.000-4.000 recém-nascidos. Na ausência de tratamento substitutivo, o HC conduz a severo e irreversível retardo mental. O HC, quando primário, é caracterizado por elevados níveis do hormônio estimulante da tireóide (TSH), resultante da diminuição da função desta glândula. Dos casos de HC, 85% são devidos à disgenesia tireoidiana (DT), um defeito na organogênese da glândula que conduz à hipoplasia, ectopia ou agenesia da glândula. Recentemente, vários genes têm sido associados a uma pequena percentagem de DT, porém, na maioria dos casos, a etiologia é ainda desconhecida. A DT ocorre de forma esporádica e apenas 2% dos pacientes têm uma história familiar, sugerindo a existência de fatores genéticos, os quais poderiam contribuir para a desordem. PAX8 é um fator transcricional de uma família Pax de proteínas de mamíferos, o qual é conhecido por reconhecer via DNA um domínio conservado "paired domain". Ele é expresso no início do desenvolvimento da tireóide e também na tireóide adulta, onde ele é importante para a ativação da transcrição dos genes da tireoglobulina (TG), da tireoperoxidase (TPO) e do transportador de sódio/iodo (NIS). Até o momento, cinco mutações no PAX8 têm sido descritas em ambas as formas esporádica e familiar da

disgenesia tireoidiana. Em somente um dos casos, o paciente foi diagnosticado com ectopia tireoidiana. O hormônio estimulante da tireóide (TSH) exerce um papel fundamental na fisiologia e na doença tireoidiana. O TSH, atuando por meio do seu receptor, é o maior estimulador do crescimento, diferenciação e função tireoidiana. A hipoplasia tireoidiana é somente encontrada em aproximadamente 5% de todos os pacientes com hipotireoidismo congênito e mutações inativantes no receptor TSH somente ocorrem em um subgrupo destes pacientes. Nesse estudo, 32 crianças com HC devido à agenesia ou ectopia tireoidiana foram investigadas para mutações no *PAX8* e trinta crianças com DT devido à hipoplasia tireoidiana foram investigadas para mutações no *rTSH*, sendo o HC detectado durante o “screening” neonatal e associado à DT pela ultra-sonografia e cintilografia. Toda a região codificada (exons) de ambos os genes foi amplificada a partir do DNA genômico, seguido por seqüenciamento direto. Encontramos duas alterações no gene *PAX8*, uma no promotor e outra no exon 1, em dois dos 32 pacientes com DT devido à ectopia tireoidiana. Todos os outros indivíduos estudados apresentaram as seqüências codificáveis dos genes *PAX8* e *rTSH* normais. Estas alterações foram investigadas quanto ao seu caráter funcional em ensaios de luciferase. Os mutantes P e PE tiveram níveis de atividade basal que não diferiram do nativo. Entretanto, a resposta ao TSH foi diminuída sugerindo que a alteração no promotor reduza a resposta transcricional induzida por cAMP. O mutante E apresentou níveis de atividade basal que não diferiram do nativo, nem na presença de TSH nem na sua ausência. Isto nos leva a concluir que a alteração no exon 1 (E)

não tem influência no fenótipo destes pacientes. Quando associada à alteração no promotor (PE), a responsável pela diminuição da resposta na presença de TSH é somente a alteração P.

SUMMARY

Perone D. *PAX8 and rTSH genes involvement in congenital hypothyroidism in patients with thyroid dysgenesis* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2004. 83p.

Congenital hypothyroidism (CH) is a relatively frequent and potentially severe disease. It affects in 1 of 3,000-4,000 newborns. In the absence of early substitutive treatment, it leads to severe and irreversible mental retardation. Primary CH is characterized by elevated levels of thyroid-stimulation hormone (TSH). 85% of all cases of CH are a consequence of thyroid dysgenesis (TD), a defect in the organogenesis of the gland leading to a hypoplastic, ectopic, or absent thyroid gland. Recently, several genes have been implicated in a small proportion of TD, but in the majority of the cases the etiology it is still unknown. Whilst most cases are sporadic, up to 2% of patients with thyroid dysgenesis have a family history of the condition, suggesting the existence of genetic factors which could contribute to the disorder. PAX8 is a transcription factor of the mammalian Pax protein family, which is known to recognize DNA via the conserved paired domain. It is expressed from the beginning of thyroid development and is still expressed in the adult thyroid, where it has been shown to activate transcription of the thyroglobulin (TG), thyroperoxidase (TPO), and sodium/iodide symporter (NIS) genes. At the moment, five causal mutations in *PAX8* have been described in both familial and sporadic forms of thyroid dysgenesis. In only one of cases, the patient was diagnosed with thyroid ectopy. The thyrotropin

(TSH) receptor plays a preeminent role in thyroid physiology and disease. TSH, acting through the TSH receptor, is the major stimulator of thyroid cell growth, differentiation and function. Thyroid hypoplasia is only found in about 5% of all patients with congenital hypothyroidism and inactivating mutations in the TSH receptor only account for a subset of these patients. In this study thirty-two children with CH due to agenesis or thyroid ectopic were investigated for *PAX8* mutations, and thirty children with TD due to thyroid hypoplasia were investigated for *TSHR* mutations. CH was detected during neonatal screening and TD was diagnosed with an ultrasound and scintigraphy. The entire *PAX8* and *rTSH* coding regions including exon-intron boundaries were amplified from genomic DNA followed by direct sequencing. We found two alterations, one of them in the promoter and another in exon 1 of *PAX8* in two of thirty-two patients with TD due thyroid ectopy. All other studied individuals had normal *PAX8* and *TSHR* coding sequences. The functional consequences of these alterations were studied by luciferase assay. The mutants P and PE had basal levels of activity that did not differ from the wild type. However, the response to TSH was diminished suggesting that these mutants impair the transcriptional activity induced by cAMP. The mutant E showed basal levels of activity that did not differ from the wild type, neither with TSH nor without TSH. These results lead us to conclude that the alteration in exon 1 (E) does not influence the phenotype of these patients. Therefore, we conclude that only the alteration P contributes to the decreasing response to TSH in the PE construct.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Hipotireoidismo congênito (HC)

O hipotireoidismo congênito (HC) constitui uma das mais freqüentes síndromes endócrinas pediátricas, cuja freqüência situa-se entre 1:3.000 e 1:4.000 nascimentos vivos (5, 6). O HC, quando não diagnosticado e tratado até o primeiro mês de vida, leva a severo e irreversível retardo mental. O diagnóstico clínico precoce é difícil e incomum, e os sinais clínicos, quando presentes, são leves como, macroglossia, hérnia umbilical, icterícia, hipotonia entre outros.

Nos primeiros meses de vida intra-uterina, os hormônios tireoidianos (HT) encontrados no feto são de origem materna. A partir da segunda metade da vida intra-uterina, o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide inicia a função de forma gradativa e os HTs se juntam aos maternos para garantir a vitalidade fetal. A presença de suplemento hormonal materno explica o porquê da maioria dos recém-nascidos, geralmente, não apresentar quaisquer sinais de hipotireoidismo ao nascer. Estes sinais poderiam se tornar claros nos meses seguintes, com envolvimento neurológico, quando o suplemento hormonal materno não foi suficiente ou quando o bebê não recebeu o hormônio exógeno. Esta é a razão porque o “screening” neonatal tem sido implementado. Entretanto, estudos mostram que alguns sinais de envolvimento psicomotor poderiam ainda aparecer quando a suplementação hormonal é iniciada depois do nascimento (dentro da 3 e 4 semanas), sugerindo que não somente a terapia substitutiva depois

do nascimento, mas também o grau de hipotireoidismo fetal, não completamente corrigido pelo suplemento hormonal materno, sejam cruciais (7). A solução consiste em analisar a função tireóidea em todos os recém-nascidos por meio da dosagem do TSH e/ou T₄ em sangue periférico. Pode ser classificado em transitório ou permanente (Tabela 1).

A causa mais comum do HC transitório é a deficiência de iodo. Os defeitos de síntese hormonal acontecem em 10-15% de crianças com HC e são geralmente associados à presença de bócio (8-13).

Tabela 1. Etiologia do hipotireoidismo congênito

Permanente
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Primário <ul style="list-style-type: none"> - Disgenesia tireoidiana: agenesia, ectopia, hipoplasia - Distúrbios hereditários da síntese hormonal tireoidiana ▪ Central [hipofisário (secundário), hipotalâmico (terciário)] ▪ Resistência periférica aos hormônios tireoidianos (RHT) *
Transitório
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Deficiência de iodo ▪ Excesso de iodo ▪ Drogas anti-tireoidianas – uso materno ▪ Anticorpos maternos bloqueadores do receptor de TSH ▪ Mutações monoalélicas no gene <i>THOX2</i> ▪ Idiopático

* Nota: A RHT pode ter manifestações clínicas complexas, como hipotireoidismo, em alguns tecidos, e hipertireoidismo, em outros.

1.2 - Disgenesia tireoidiana (DT)

Nos países iodo-suficientes, cerca de 85% do hipotireoidismo permanente são decorrentes de defeitos na formação glandular durante a embriogênese, denominando-se disgenesia tireoidiana (DT) (8-11, 13, 14). A disgenesia pode decorrer de: agenesia glandular, 40% dos casos, definidos como ausência de tecido tireoidiano detectável; ectopia, 40%, com tecido tireoidiano encontrado desde a base da língua até o mediastino; ou hipoplasia, aproximadamente 5%, nos quais a glândula de tamanho reduzido se situa em posição cervical normal (10).

1.2.1 - Bases moleculares da disgenesia tireoidiana

A causa da DT está apenas parcialmente esclarecida. Na grande maioria dos casos, a DT é esporádica, mas, em aproximadamente 2%, é familiar (15, 16). Além dos casos familiares, a procura de uma etiologia genética para essa doença de caráter essencialmente esporádico fundamenta-se: no fato de o sexo feminino ser duas a três vezes mais afetado do que o masculino; na elevada prevalência de anormalidades congênitas extra-tireoidianas entre as crianças com HC comparadas com a população em geral (8-13, 17-23); nas descobertas dos fatores transcricionais para o desenvolvimento da tireóide; e na importância das vias de sinalização envolvidas na proliferação e diferenciação celular (1, 2, 4, 24-29). Estudos epidemiológicos têm mostrado uma baixa incidência da doença em crianças afro-americanas e alta incidência em espanhóis (30). Todos estes estudos sugerem um defeito genético.

Por outro lado, a existência de casos esporádicos de DT (2, 4) e o fato de haver 100% de discordância em gêmeos monozigotos (31) são argumentos contra uma simples etiologia monogênica e sugerem uma etiologia poligênica com uma possível influência de fatores ambientais ou eventos casuais no início da embriogênese.

Considerando-se estes aspectos contrastantes, podem ser advogados vários mecanismos genéticos para explicar alguns casos de HC. Primeiro, a disgenesia pode ocorrer em consequência de mutações nos genes envolvidos na embriogênese tireoidiana ou na proliferação e diferenciação da glândula normalmente formada. Segundo, a disgenesia poderia ser um distúrbio genético complexo, no qual vários genes colaboram para produzir o fenótipo e fatores ambientais poderiam estar igualmente envolvidos, etiologia poligênica ou multifatorial.

Os genes candidatos à patogênese da disgenesia tireoidiana são aqueles conhecidos por estarem envolvidos na ontogenia da tireóide. As evidências correntes sugerem que o desenvolvimento embriológico da glândula e sua migração à localização cervical final, dependam da inter-relação de proteínas codificadas por, pelo menos, três genes: *TTF1* (thyroid transcription factor 1) , também chamado *TITF1*, *T/EBP* ou *NKX2.1* (25, 32, 33); *TTF2* (thyroid transcription factor 2), também conhecido como, *TITF2*, *FKHL15* ou *FOXE1* (forkhead box E1) (14, 26, 27, 34, 35); e *PAX8* (paired box 8) (1, 2, 4, 29). A Tabela 2 mostra a presença de mutações nesses genes, em pacientes portadores de DT, evidenciando que existe, na

literatura, poucos estudos focando esses genes como candidatos para explicar a patologia.

Tabela 2. Disgenesias tireoidianas e mutações em fatores de transcrição tireoidianos.

Etiologia Molecular	Apresentação Clínica
Deleção ou mutações pontuais no gene <i>TTF1</i> (25, 32, 33)	Agenesia tireoidiana com alterações pulmonares e fenótipo neurológico
Mutação no gene <i>TTF2</i> (26, 27, 35)	Agenesia tireoidiana com palato fendido e “spiky hair”
Mutação no gene <i>PAX8</i> (4, 29)	Ectopia tireoidiana
Mutação no gene <i>PAX8</i> (1, 2, 4)	Hipoplasia tireoidiana

Na tireóide, estes três fatores expressam-se em conjunto e ligam-se aos promotores da tireoglobulina (Tg), da tireoperoxidase (TPO) e do receptor do TSH (rTSH), resultando na expressão de genes específicos da tireóide (36).

TTF1. Em camundongos, o *Ttf1* é importante para o desenvolvimento dos pulmões, tireóide e parte anterior do cérebro. A função do *Ttf1*, durante os passos iniciais do desenvolvimento tireoidiano, é demonstrada em experimentos realizados em camundongos “knockout”, onde os homozigotos exibem ausência total de tecido tireoidiano, ausência

da região anterior do cérebro e substituição dos pulmões por estruturas semelhantes a bolsas (25). Nos animais homozigotos pelo “knockout”, o primórdio tireoidiano não migra da sua origem e, eventualmente, desaparece, resultando em hipotireoidismo neonatal (25, 32). Os animais heterozigotos desenvolvem-se normalmente (25), embora eles apresentem um sutil fenótipo neurológico (32).

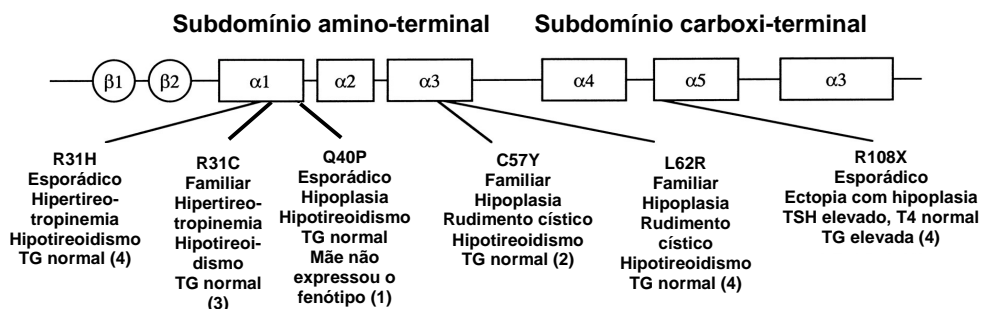
A partir destes estudos, o *TTF1*, localizado no cromossomo 14q13 e codificado por três exons (37), foi o primeiro gene humano que ganhou interesse como candidato para o HC. Entretanto, muitos estudos em pacientes com vários tipos de DT não têm encontrado mutações neste gene (38-40). Três pacientes com deleção em apenas um alelo do gene *TTF1* apresentaram uma variedade de sintomas que comprometem o sistema nervoso central (SNC), a tireóide e os pulmões (41, 42). Provavelmente, o fato de recentes trabalhos demonstrarem que essa patologia é poligênica explicaria a evidência do hipotireoidismo em pacientes heterozigóticos para a mutação no *TTF1* (1-4). Mutações “missenses” heterozigóticas neste gene causam predominantemente anormalidades neurológicas, problemas respiratórias e hipotireoidismo congênito transitório, com o nível de TSH elevado (32, 33).

TTF2. O *TTF2* pertence à família de proteínas que se ligam ao DNA por meio do “forkhead domain” (34). O gene *TTF2* encontra-se no cromossomo 9q22 e é codificado por apenas um exon (43). Em camundongos (27) e em humanos, os sinais clínicos foram semelhantes. Dois irmãos homozigóticos para a mutação “missense” (A65V) dentro do

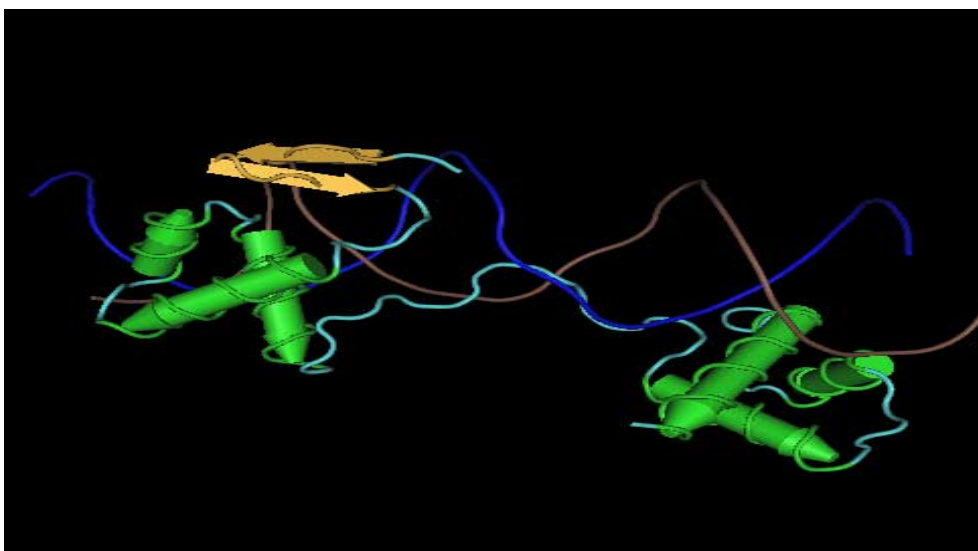
“forkhead domain” (26) e em dois membros de uma família de pais consangüíneos que apresentaram a mutação “missense” (S57N), também dentro do “forkhead domain” (35), apresentaram: severo hipotireoidismo, devido à ausência completa da tireóide, palato fendido e “spiky hair” (síndrome de Bamforth-Lazarus) (44).

PAX8. O *PAX8*, um dos reguladores transcricionais da organogênese tireoidiana, é expresso nos rins, na tireóide e em várias áreas do SNC. O gene *PAX8* codificador humano situa-se no cromossomo 2q12-q14 e tem pelo menos 10 exons. Na tireóide, o *PAX8* também é importante para a expressão gênica da Tg, TPO e do NIS (45, 46). Pertence à família de proteínas Pax presentes em mamíferos constituída por nove proteínas, que interagem com DNA por meio de domínios específicos “paired domain” (47) (Figura 1), essenciais para a formação de vários tecidos, conforme sugerido por análises em roedores mutantes. Em particular, estão envolvidas na regulação dos passos iniciais do desenvolvimento de órgãos, definindo a especificação celular regional (48, 49).

Macchia *et al.* (1998) estudaram 145 neonatos com hipotireoidismo congênito devido à disgenesia tireoidiana e encontraram mutações no *PAX8* em cinco pacientes com diferentes fenótipos (Figura 1) (4). Isto foi confirmado por estudos subseqüentes (Figura 1) (1-3).



A



B

Figura 1. A) DNA “binding domain” do PAX8 e mutações no gene *PAX8* associadas ao hipotireoidismo congênito.

B) Estrutura cristalográfica do PAX6 no DNA. Duas β - “sheets” (amarelo) seguidas por dois domínios pareados “paired box domains” (verde), os quais são ambos formados por três α -hélices. A figura foi gerada através do Cn3D 4.1 software do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e retirada de Xu *et al* (50). PAX8 é altamente homólogo em seu DNA “binding domain”.

1.2.2 – Hipoplasia tireoidiana associada a mutações no rTSH

O rTSH pertence à superfamília de receptores associados à proteína G, que exibe estrutura comum consistindo de: sete segmentos transmembrana, três alças extracelulares, três alças intracelulares, extremidade extracelular amino-terminal e intracelular carboxi-terminal. Em humanos, seu gene codificador situa-se no cromossomo 14q31. O receptor é responsável pela intermediação das ações do TSH no crescimento, metabolismo e função celulares, com o objetivo final de síntese e secreção hormonais e proliferação.

O gene do rTSH inicia sua expressão quando a tireóide primitiva encontra-se em sua posição cervical final, traduzindo-se pela proliferação, diferenciação folicular e começo da função (51). Esta expressão acredita-se resultar da interação recíproca do TTF1, TTF2 e PAX8 (36). Portanto, mutações inativadoras no rTSH que resultam na perda de sua função podem não ser importantes para a migração da tireóide (25, 28, 52-54), mas poderiam afetar negativamente a proliferação, a diferenciação e a função da glândula.

As primeiras mutações no gene do rTSH com perda da função foram descritas em 1995 por Sunthornthepvarakul *et al.* em pacientes com resistência ao TSH (53), uma condição clínica chamada “hipertireotropinemia eutireoidiana”. Nestes pacientes, que são homocigotos ou heterocigotos compostos para mutações inativas, os níveis elevados de TSH superam a resistência parcial do receptor de TSH. Se há inativação dos dois alelos, a resistência é mais severa ou completa, conduzindo ao

hipotireoidismo com hipoplasia (28). Até o momento, foram descritas 17 mutações com perda de função, onde nove mutações encontram-se no domínio extracelular e oito mutações localizam-se nos segmentos transmembrana (55, 56). Figura 2.

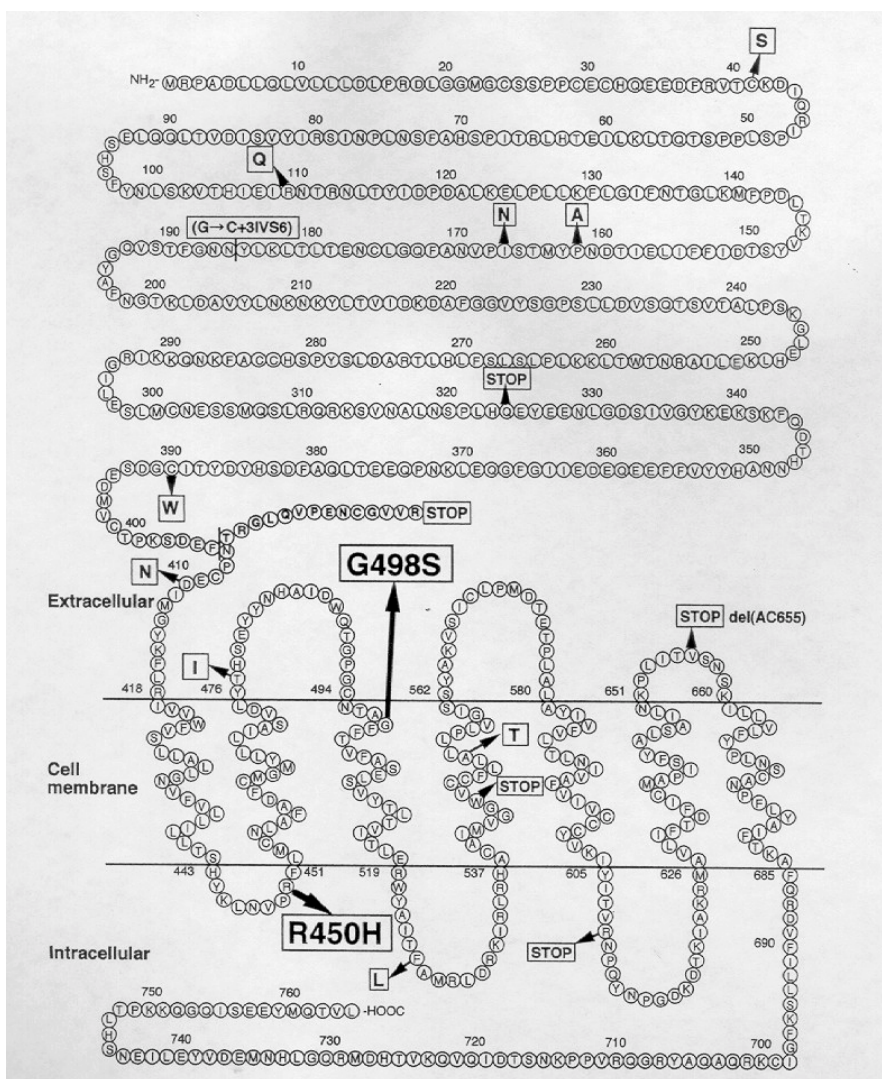


Figura 2. Mutações inativadoras encontradas no gene do receptor TSH em pacientes com resistência ao TSH. A figura foi retirada de Nagashima *et al.* (2001) (56).

2 – OBJETIVOS

O presente projeto propôs analisar o mecanismo molecular dos diferentes tipos de condições patológicas que conduzem ao hipotireoidismo congênito devido à DT em uma amostra da população brasileira investigando-se o papel do *PAX8* e do *rTSH*.

Na coorte de crianças que foram cuidadosamente caracterizadas em termos bioquímicos e morfológicos, pretendeu, entre os seus objetivos, ampliar, com o estudo de pacientes, o conjunto de conhecimentos de fisiopatologia tireoidiana tal como a formulamos hoje, mas dentro da ótica da genética molecular.

3 – MÉTODOS

3.1 – Amostra

Para atingir nosso objetivo, propusemos o estudo sistemático de uma coorte de crianças com diagnóstico de hipotireoidismo congênito confirmado e sem nenhuma malformação congênita. Elas vêm sendo acompanhadas pelo Núcleo de Pesquisas em Apoio Diagnóstico (NUPAD) Universidade Federal de Minas Gerais e triadas pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal – MG. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética com o consentimento informado dos pais das crianças.

Recebemos 113 amostras de sangue de crianças de ambos os sexos, entre 3 e 4 anos, com diagnóstico etiológico de hipotireoidismo congênito, que estão em acompanhamento. Estas crianças não apresentam nenhuma malformação congênita. Destas 113 amostras, 56 (49,5%) foram diagnosticadas como de hipoplasia (Anexo A), 25 (22%) como de hipertireotropinemia (Anexo B), 19 (17%) como de ectopia (Anexo C) e 13 (11,5%) como de agenesia (Anexo D) (Figura 3). Trabalhamos, também, com amostras de glândulas ectópicas de duas pacientes, uma delas proveniente da cidade de São Paulo e a outra de Botucatu – SP. A partir do diagnóstico clínico e morfológico, analisamos as regiões codificadas dos genes *PAX8* e do *rTSH* e também a região promotora do *PAX8* e o exon 1 deste gene, que não é codificado.

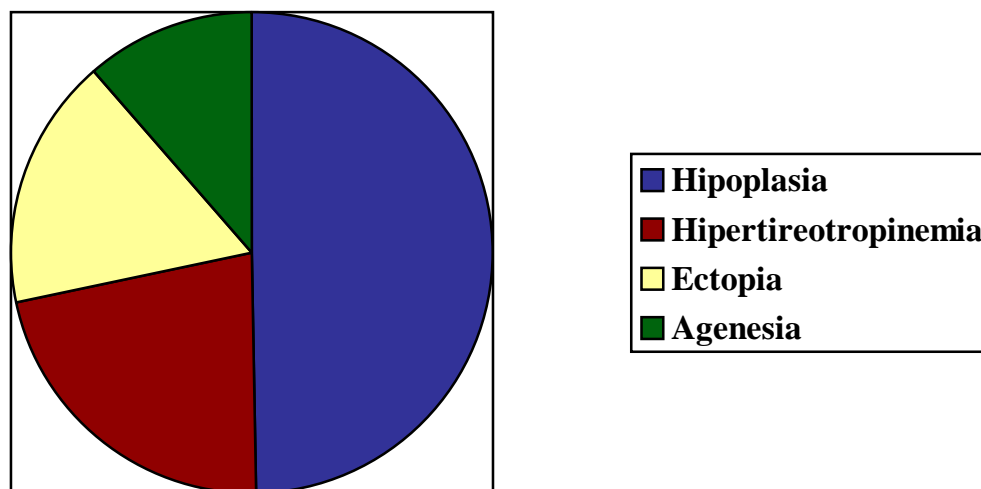


Figura 3. Amostragem dos pacientes com diagnóstico morfológico de hipoplasia (49,5%), de hipertireotropinemia (22%), de ectopia (17%) e de agenesia (11,5%).

Os valores do TSH e do T₄ livre foram obtidos, após os 3 anos de idade para a confirmação do diagnóstico, com um método quimioluminescente “kit DPC” (Diagnostic Products Corporation), (Los Angeles – USA), cujos valores de referências são, respectivamente: 0,5 – 5,0 µUI/ml e 0,8 – 1,9 ng/dl. A tireoglobulina (Tg) foi mensurada com um teste imunofluorimétrico, cujo valor normal é de 30,0 – 60,0 ng/ml.

3.2 – Extração de DNA e análise de seqüência

A metodologia foi executada a partir da obtenção de DNA genômico dos afetados, respectivos irmãos e pais para estudo molecular relativo aos genes *PAX8* e *rTSH*, na tentativa de encontrarmos mutações

que justificassem o fenótipo. Amplificamos e seqüenciamos porções desses genes (exons) e comparamos as seqüências obtidas com as normais.

3.2.1 – Isolamento de DNA genômico a partir de sangue periférico

O DNA genômico foi isolado de leucócitos periféricos (sangue total), seguindo-se procedimento descrito por Sambrook *et al.* (1989) (57). A concentração do DNA foi determinada pela leitura à densidade ótica de 260 nm (1DO = 50 µg/ml) e a razão 260/280 nm foi sempre superior a 1,8.

Com a finalidade de verificar a integridade da amostra de DNA, utilizamos o gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e corremos 500 ng de DNA. A eletroforese foi realizada na corrente constante de 40 mA por aproximadamente 45 minutos com tampão TAE (Tris/Ácido acético/EDTA) 1X. O gel foi colocado sobre o “Foto UV 450 DNA Transilluminator” e o DNA visualizado e captado pelo programa de computador “Labworks”. O DNA digerido com a enzima de restrição *HindIII* foi usado como padrão (100 pb) para comparação de peso molecular.

3.2.2 – Pesquisa de mutações no gene do receptor de TSH e no gene do PAX8

Para o receptor TSH, utilizamos os “sense primers” e os “anti-sense primers” de acordo com as seqüências descritas em 1996 por De Roux *et al.* (58) (Tabela 3) e a reação da polimerase em cadeia (PCR) de acordo com Asubel *et al.* (1989) (59).

A PCR foi realizada em um volume total de 100 µl, onde utilizamos o kit para PCR da Invitrogen (Brasil) nas seguintes concentrações: tampão 1X (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,4), 3,75 mM MgCl₂, 0,15 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato, 10 pmol de cada oligonucleotídeo (Tabela 3), 500 ng de DNA genômico e 1,25 U de Taq DNA polimerase.

A amplificação foi realizada em termociclador da marca Eppendorf com gradiente de temperatura, utilizando a técnica “hot start”. A primeira parte da reação, “lower mix”, com um volume de 25 µl, foi preparada para otimizar a reação com o “Ampliwax” da Applied Biosystems (Branchburg, New Jersey – USA). Para o derretimento e solidificação da cera, o termociclador foi programado da seguinte forma: um ciclo de 5 minutos à temperatura de 80°C (etapa 1); um ciclo de 3 minutos a 25°C (etapa 2); temperatura de 4°C (etapa 3).

Para a segunda parte da reação, “upper mix”, onde foram adicionados o DNA e a Taq DNA polimerase, tornando assim possível a amplificação, completamos o volume para 100 µl com o tampão 1X (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,4). O termociclador foi programado da seguinte forma: um ciclo de 3 minutos a 94°C (etapa 1); um ciclo de 45 segundos a 94°C, para desnaturação do DNA (etapa 2); um ciclo de 45 segundos a 53°C, para o pareamento dos “primers” (etapa 3); um ciclo de 45 segundos a 72°C, para a extensão do “primer” (etapa 4); repetição de 29 vezes, a partir da etapa 2 (etapa 5); um ciclo de 3 minutos a 72°C (etapa 6); temperatura de 4°C (etapa 7).

Os produtos da PCR, dos 10 exons do receptor de TSH, após a purificação pelo “kit da Marligen Bioscience” (Germany), foram submetidos a um seqüenciamento direto, no seqüenciador ABI Prism 3100 da Applied Biosystems (Califórnia, USA), onde as seqüências de DNA obtidas de cada paciente foram comparadas com as dos indivíduos normais.

Os exons 1 a 10 e a região promotora do *PAX8* foram amplificados em um volume total de 50 µl usando os pares de “primers” indicados na Tabela 4, temperatura de pareamento dos “primers” e extensão apropriados segundo Macchia *et al.* (1998), Vilain *et al.* (2001) e Congdon *et al.* (2001) (1, 2, 4).

Para a amplificação dos exons 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 e região promotora, usamos o kit da Invitrogen (Brasil) nas seguintes concentrações: tampão 1X (50 mM KCl, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,4), 2,5 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTPs, 1,25 U de Ampli-Taq DNA Polimerase. Como iniciadores da reação, utilizamos 10 pmoles de cada oligonucleotídeo descritos na Tabela 4 e 500 ng de DNA genômico.

O termociclador foi programado da seguinte forma: um ciclo de 5 minutos à temperatura de 93°C (etapa 1); um ciclo de 45 segundos à temperatura de 93°C, para a abertura das fitas (etapa 2); um ciclo de 45 segundos à temperatura de 60°C, para o pareamento dos “primers” (etapa 3); um ciclo de 45 segundos à temperatura de 72°C, para a extensão do exon (etapa 4); repetição de 38 vezes, a partir da etapa 2 (etapa 5); um ciclo de 5 minutos à temperatura de 72°C (etapa 6); temperatura de 4°C (etapa 7).

Para a amplificação dos exons 2 e 10, foi feita a seguinte reação com um tampão que permite amplificar regiões ricas em GC. Para um volume final de 50 μ l utilizamos 5 μ l de tampão Masafumi 10X (1,5 M Tris pH 8,8; 1 M $MgCl_2$; 1 M $(NH_4)_2SO_4$; 11 μ l β -mercaptoetanol e H_2O qsp 1,5 ml), 1,5 mM dNTPs, 10 pmol/ μ l “sense primer”, 10 pmol/ μ l “anti-sense primer”, 2,5 U Taq DNA polimerase e 10% DMSO. A concentração de DNA utilizada foi de 500 ng, completando-se o volume para 50 μ l com água “milliQ” autoclavada.

Sendo as condições para amplificação: um ciclo de 5 minutos, à temperatura de 95°C (etapa 1); um ciclo de 1 minuto à temperatura de 94°C, para a desnaturação do DNA (etapa 2); um ciclo com gradiente de temperatura de 54 a 60°C por 1 minuto, para o pareamento dos “primers” (etapa 3); um ciclo de 1 minuto a 72°C, para a extensão do exon (etapa 4); repetição de 39 vezes, partindo-se da etapa 2 (etapa 5); um ciclo de 10 minutos a 72°C (etapa 6); temperatura de 4°C (etapa 7).

3.3 – Genotipagem

Realizamos a técnica da genotipagem nos pacientes SPA – 128 e SPA – 147, nos quais encontramos alterações no promotor e no exon 1 do *PAX8*, como também em seus familiares. Para a reação, fizemos um “premix”, onde utilizamos 11 pares de “primers”, D2S165, D2S367, D2S286, D2S139, D2S160, D2S142, D2S364, D2S117, D2S325, D2S126, D2S125, os quais amplificam regiões localizadas ao longo do cromossomo 2. Utilizamos 0,5 μ l de cada “primer” a 10 pmol/ μ l, 0,375 μ l de dNTP a 10 mM

(Promega - USA), 1,5 µl de tampão Masafumi 10X, 0,12 µl de Taq DNA polimerase, 12 µl de H₂O e 3 µl de DNA a 10 ng/µl em um volume final de 15 µl.

O termociclador foi programado da seguinte forma: um ciclo de 5 minutos à temperatura de 95°C (etapa 1); um ciclo de 15 segundos à temperatura de 94°C (etapa 2); um ciclo de 15 segundos à temperatura de 55°C (etapa 3); um ciclo de 30 segundos à temperatura de 72°C (etapa 4); repetição de 9 vezes, a partir da primeira etapa (etapa 5); um ciclo de 15 segundos à temperatura de 89°C (etapa 6); um ciclo de 15 segundos à temperatura de 55°C (etapa 7); um ciclo de 30 segundos à temperatura de 72°C (etapa 8); repetição de 19 vezes a partir da etapa 6 (etapa 9); um ciclo de 10 minutos à temperatura de 72°C (etapa 10).

Em um gel de poliacrilamida a 4,25%, pudemos ver pequenas diferenças de tamanho entre os dois alelos, que são devidas à composição polimórfica dos microssatélites nestes fragmentos. Esta análise foi realizada em um seqüenciador ABI Prism 377 da Applied Biosystems (Califórnia – USA), utilizando o programa Genescan.

3.4 – Amplificação da região promotora e exon 1 do *PAX8* para a clonagem utilizando o vetor pCRBlunt e para a subclonagem utilizando o vetor de expressão pGL3

A região promotora e o exon 1 do *PAX8*, onde identificamos alterações de bases na seqüência do DNA, foram juntamente amplicados por PCR, utilizando o DNA normal e o DNA dos pacientes. Estes fragmentos

foram clonados no vetor pCRBlunt e posteriormente subclonados no vetor pGL3 Basic, que tem a região codificadora para a enzima luciferase (Figura 4). O “sense primer” (-1101, relativo ao A do ATG inicial) foi construído com um sítio de restrição para a enzima *MluI*, 5' – TTTTACGCGTGTGACAATTTTGTAGCCTG – 3' e o “anti-sense primer” (-1) foi construído com um sítio de restrição para a enzima *BglII*, 5' – TTTAGATCTCGCCGGGGAGTCGCTCGCAG – 3'.

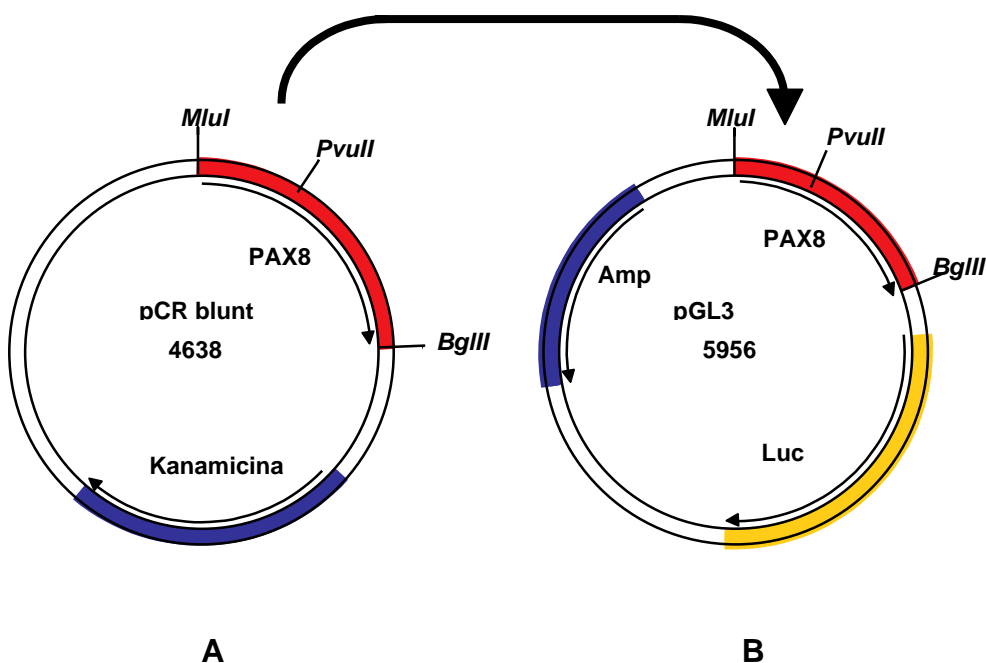


Figura 4. A) Vetor pCRBlunt utilizado na clonagem do promotor do gene *PAX8*, com o gene de resistência à kanamicina.

B) Vetor pGL3 utilizado na subclonagem do promotor do *PAX8*. O promotor do *PAX8* encontra-se “upstream” ao gene repórter da luciferase. Este vetor também contém o gene que confere resistência à ampicilina.

Amplificamos o fragmento por PCR utilizando o seguinte protocolo, com a *Pfu* polimerase (Promega – USA), a qual, em contraste

com a Taq polimerase, tem a capacidade “proof-reading” e, portanto, uma porcentagem menor de erro:

Protocolo da reação de amplificação por PCR do fragmento para a clonagem em pCRBlunt e posterior subclonagem em pGL3.

Produto	Volume (µl)
H ₂ O destilada qsp 50 µl	40
Tampão <i>Pfu</i> 10X	5
dNTP 10 mM	1
DNA (100 ng/µl)	1
<i>Primer</i> -1101 (10 pmol/µl)	1
<i>Primer</i> -1 (10 pmol/µl)	1
<i>Pfu</i> DNA polimerase (2,5 U/µl)	1

O termociclador foi programado de acordo com os seguintes ciclos:

Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
94	10'	1
94	1'	5
72	3'	
94	1'	5
68	1'	
72	3'	
94	1'	30
65	1'	
72	3'	
72	15'	1
4	∞	

3.5 – Extração dos fragmentos de DNA do gel de agarose

De acordo com o protocolo do “kit Qiagen” (QIAquick Gel Extraction Kit 250) (Hilden, Germany), ordenadamente:

3.5.1 – Fizemos uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1% em brometo de etídeo dos fragmentos amplificados pela PCR.

3.5.2 – Retiramos o fragmento de DNA do gel de agarose.

3.5.3 – Adicionamos 500 µl de tampão QG.

3.5.4 – Incubamos a 50°C por 10 minutos, agitamos o tubo a cada 3 minutos durante a incubação.

3.5.5 – Adicionamos 10 µl de acetato de sódio 3 M, pH 5,2.

3.5.6 – Acrescentamos 125 µl de isopropanol na amostra e misturamos.

3.5.7 – Aplicamos a amostra na coluna e centrifugamos por 1 minuto a 13.000 rpm.

3.5.8 – Para lavar, adicionamos 750 µl de tampão PE à coluna, incubamos por 5 minutos e centrifugamos durante 1 minuto.

3.5.9 – Repetimos a centrifugação por 30 segundos.

3.5.10 – Colocamos a coluna dentro de um tubo de 1,5 ml.

3.5.11 – Eluímos o DNA com 30 µl de H₂O.

O fragmento amplificado foi inicialmente clonado no vetor pCRBlunt (Stratagene - USA).

3.6 – Reação de Ligação

Produto	Volume (μ l)
Vetor pCRBlunt	1
Produto PCR	5
Tampão ligase (Promega – USA)	1
T4 DNA ligase 3 U/ μ l	1
H ₂ O qsp 10 μ l	2

Incubamos a 16°C *overnight*.

3.7 – Transformação de células de *Escherischia coli* linhagem TOP 10 (Invitrogen - USA)

Para a transformação da linhagem celular com o plasmídio pCRBlunt ligado ao inserto, nativo e mutantes (P, E e PE), utilizamos a técnica descrita abaixo:

3.7.1 – Aquecemos o meio de cultura SOC (Invitrogen - USA) a 37°C.

3.7.2 – Descongelamos as células TOP 10 no gelo por 20 minutos (estas células têm membrana celular competente e são estocadas em alíquotas de 50 μ l a -80°C).

3.7.3 – Cuidadosamente pipetamos 10 μ l da reação de ligação dentro do tubo com as células viáveis.

3.7.4 – Incubamos a mistura, células competentes com o produto da ligação, no gelo por 30 minutos.

3.7.5 – Aquecemos a mistura a 42°C por exatamente 45 segundos.

3.7.6 – Rapidamente colocamos as células viáveis no gelo por 2 minutos.

3.7.7 – Adicionamos 250 µl de meio SOC dentro da mistura.

3.7.8 – Colocamos no “shaker” a 225 rpm por 1 hora.

3.7.9 – Pré-aquecemos placas LB com kanamicina.

3.7.10 – Pipetamos 200 µl da mistura no centro de cada placa e depois semeamos.

3.7.11 – Incubamos as placas a 37°C “overnight”.

3.7.12 – No dia seguinte, foram preparados LB líquido com 50 µl/ml de kanamicina e alíquotas com 3 ml foram distribuídas em tubos de 15 ml.

3.7.13 - Pegamos colônias isoladas, semeamos nos tubos e incubamos a 37°C por 18 horas.

3.7.14 - No dia seguinte, extraímos o vetor por “miniprep”.

3.8 – Miniprep

Para a extração do plasmídio, utilizamos o “kit Qiagen” (QIAprep Spin Miniprep Kit 250) (Hilden, Germany), com o seguinte protocolo:

3.8.1 – Transferimos 1,5 ml de cada colônia para tubos de 1,5 ml.

3.8.2 – Centrifugamos por 2 minutos.

3.8.3 – Removemos o sobrenadante.

3.8.4 – Adicionamos 250 µl de tampão P1 (a 4°C) e ressuspendemos o sedimento bacteriano com a pipeta.

3.8.5 – Adicionamos 250 µl de tampão P2, o qual lisa as células, e misturamos gentilmente por inversão do tubo.

3.8.6 – Adicionamos 350 µl de tampão N3, o qual promove a precipitação das proteínas, e invertemos o tubo imediatamente, porém gentilmente.

3.8.7 – Centrifugamos por 10 minutos.

3.8.8 – Transferimos o sobrenadante para uma coluna de QIAprep.

3.8.9 – Centrifugamos por 1 minuto.

3.8.10 – Para lavar, adicionamos 750 µl de tampão PE, incubamos por 2 minutos e centrifugamos por mais 1 minuto para remover o tampão de lavagem restante.

3.8.11 – Transferimos a coluna para um tubo de 1,5 ml.

3.8.12 – Adicionamos 50 µl de H₂O no centro de cada coluna.

3.8.13 – Incubamos por 1 minuto e então centrifugamos por 1 minuto.

3.9 – Digestão do produto da miniprep com as enzimas *MluI* e *BglII* para a confirmação da presença do inserto

Produto	Volume (µl)
Plasmídio pCRBlunt PAX8	8
Tampão D 10X (Promega – USA)	2
<i>MluI</i>	1
<i>BglII</i>	1
H ₂ O destilada qsp 20 µl	8

Incubamos a 37°C por 1 hora e 30 minutos.

Os produtos obtidos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e as bandas foram analisadas quanto a seus pesos moleculares característicos do vetor pCRBlunt (3,5 kb) e dos fragmentos clonados (1,1 kb) (Figura 2), nativo e mutantes. As bandas destes últimos foram retiradas do gel e colocadas em microtubos de 1,5 ml da marca Eppendorf (Hamburg, Germany) e o DNA foi extraído de acordo com o protocolo do “kit Qiagen” (QIAquick Gel Extraction Kit 250) (Hilden, Germany). Em seguida, fizemos o seqüenciamento.

3.10 – Seqüenciamento, a fim de afastar erros de incorporação foram seqüenciados os produtos nativo e mutantes

Produto	Volume (µl)
DNA Miniprep	4,5
T7 Primer (1 pmol/µl)	1,5
Sequencing Reaction mix *	4,0

* Sequencing Reaction mix (Applied Biosystems - USA) que contém tampão, enzima, dNTP e ddNTP marcados.

Para a reação de seqüenciamento, utilizamos o seguinte programa:

Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
96	30"	24
52	15"	
60	4'	
4		∞

Como as análises de seqüências confirmaram que o produto obtido era o inserto desejado, partimos então para a subclonagem dos fragmentos digeridos no vetor pGL3 (Figura 4), o qual contém o cDNA da luciferase. Para isso, digerimos o plasmídeo pGL3 com as mesmas enzimas utilizadas para a digestão do inserto e, em seguida, fizemos a ligação deste último no vetor de expressão digerido:

3.11 – Digestão do plasmídeo pGL3

Produto	Volume (µl)
H ₂ O	10
Plasmídeo (100 ng/µl)	6
Tampão D 10X (Promega - USA)	2
<i>MluI</i>	1
<i>BglII</i>	1
Volume total da reação	20

3.12 – Reação de Ligação dos insertos, nativo e mutantes no vetor de expressão pGL3

Produto	Volume (µl)
pGL3 (digerido com <i>MluI</i> – <i>BglII</i>)	2
Inserto <i>PAX8</i> (digerido com <i>MluI</i> – <i>BglII</i>)	6
Tampão ligase (Promega - USA)	1
Ligase 3 U/µl (Promega - USA)	1
Volume total	10

Incubamos a 16°C “overnight”.

Após a reação de ligação, fizemos a transformação utilizando as células TOP 10 e o mesmo protocolo já descrito para a transformação com o plasmídio pCRBlunt. Mudamos somente o antibiótico, porque o vetor pGL3 contém o gene de resistência para a ampicilina (Figura 4), utilizando, portanto, no lugar da kanamicina, a ampicilina. Os clones foram amplificados no meio LB líquido, os plasmídios foram extraídos pela “miniprep” e digeridos utilizando as enzimas *MluI* e *BglII*, para análise de restrição.

Os mutantes simples (P e E1) foram gerados subsequentemente pela remoção de um fragmento da seqüência normal e substituição deste pelo fragmento *MluI* – *PvuII* (P) ou *PvuII* – *BglII* (E1) (Figura 5).

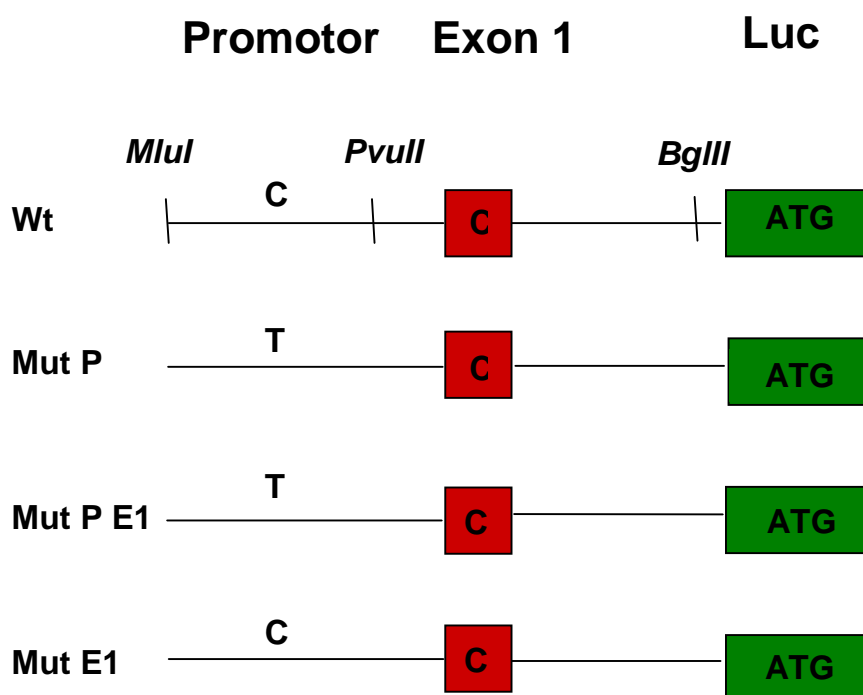


Figura 5. Estrutura dos clones finais com as alterações na região promotora, P (-983C>T) e no exon 1, E (-465G>C) do *PAX8*.

3.13 – Transfecção em células FRTL-5 (Fisher Rat Thyroid Cell Line - 5)

A consequência funcional das alterações identificadas no gene do *PAX8* foi determinada por ensaios de expressão e atividade após transfecção em células FRTL-5 (60).

As células FRTL-5 foram cultivadas em meio F-12 Coon's modificado (Gibco – USA). Para 1000 ml de meio, adicionamos 2,68 g de bicarbonato de sódio e os seguintes hormônios: 250 µl de TSH a 2,5 U (concentração final de 5 mU/ml); 500 µl de insulina a 10mg/ml (concentração final 10 µg/ml) e 32 µl de hidrocortisona a 50 µg/ml (concentração final 3,2 ng/ml).

Inicialmente, verificamos que essas células tendem a se aglomerar para formar estruturas semelhantes aos folículos (Figura 6). Um dia antes da transfecção, retiramos o meio dessas células e as lavamos uma vez com 10 ml de PBS (Phosphate Buffered Saline) (Gibco – USA). Em seguida, colocamos 3 ml de tripsina (Gibco – USA) e incubamos por 5 minutos a 37°C.

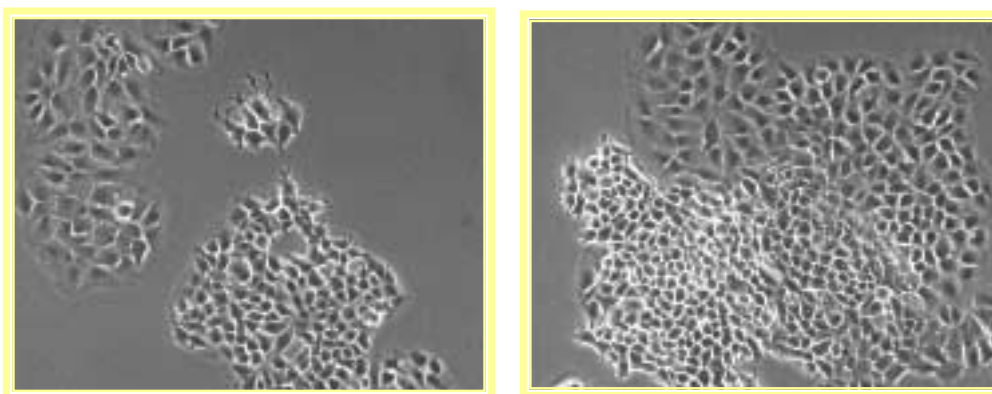


Figura 6. FRTL-5 cultivadas em meio F-12 Coon's modificado, apresentando-se aglomeradas para formar estruturas semelhantes a folículos.

Após este tempo, acrescentamos 5 ml de meio F-12 Coon's modificado (Gibco – USA) (o soro bovino fetal do meio inativa a tripsina) e pipetamos 20 vezes para que as células desgrudassem umas das outras.

Então, preparamos as placas, uma para estoque e uma com 12 poços para a transfecção. Na placa com 12 poços, colocamos em cada poço (três para cada amostra) 1 ml de meio F-12 Coon's modificado e 450 µl da suspensão de células e, na placa de estoque, colocamos 10 ml de meio Coon's modificado e o restante da suspensão.

No dia seguinte, realizamos a técnica da transfecção com Lipofectamina (Invitrogen - USA): este ensaio foi feito em triplicata e repetido três vezes, as células foram transfectadas com os clones mostrados na Figura 5 e, como controle do ensaio, utilizamos o plasmídio pGL3 sem o promotor subclonado. Para isto, preparamos duas soluções:

Solução A

	Por orifício	Por grupo (3x)
DNA (100 ng/ μ l)	1000 ng = 10 μ l	30 μ l
Optimem sem soro (Invitrogen – USA)	50 μ l	150 μ l
Reagente Plus (Invitrogen – USA)	5 μ l	15 μ l

Incubamos a solução A à temperatura ambiente por 15 minutos.

Solução B

	Por orifício	Por grupo (3X)
Lipofectamina (Invitrogen –USA)	3 μ l	9 μ l
Optimem sem soro (Invitrogen – USA)	50 μ l	150 μ l

A solução de transfecção foi preparada adicionando-se 159 μ l da solução B à solução A e incubando-se à temperatura ambiente por 15 minutos. Durante esse tempo, preparamos as células: lavamo-as uma vez com 500 μ l de PBS e então adicionamos 400 μ l de Optimem sem soro. Após a incubação da solução de transfecção, acrescentamos 113 μ l dessa solução em cada poço da placa, incubamos por 3 horas e adicionamos 500

μ l de meio F-12 Coon's modificado. Após 24 horas, trocamos o meio e incubamos por mais 24 horas. Finalmente, realizamos a lise celular e depois o ensaio de Luciferase.

3.14 – Ensaio de Luciferase

3.14.1 – Preparo das soluções

A) Tampão de lise

Solução estoque	Concentração final	qsp 8 ml
Triton X-100	1%	80 μ l
DTT 1 M	1mM	8 μ l
Tampão (GME) Luc *	-	8 ml

*Tampão GME Luc: 25 mM tampão GlyGly a 0,5 M pH 7,8; 15 mM de $MgSO_4$ a 1M; 4 mM de EGTA a 0,5 M, completar o volume para 500 ml com H_2O e estocá-lo a 4°C.

B) Tampão de ensaio

Solução estoque	qsp 30 amostras
Tampão (GME) Luc	9 ml
K_2HPO_4 100 mM	1,8 ml
DTT 1 M	12 μ l
ATP 200 mM	120 μ l

C) Solução Luciferina

Solução estoque	qsp 40 amostras
Luciferina	1 ml
Tampão (GME) Luc	4 ml
DTT 1 M	50 µl

3.14.2 – Procedimento

3.14.2.1 - O tampão de lise foi pré-aquecido em banho-maria a 37°C e os tampões de ensaio e de luciferina permaneceram no gelo.

3.14.2.2 - Aspiramos o meio das células, adicionamos 500 µl de tampão de lise e incubamos a 37°C por 5 minutos.

3.14.2.3 - Removemos 100 µl do lisado colocando-os em tubos de ensaio.

3.14.2.4 - Adicionamos 400 µl do tampão de ensaio nos tubos.

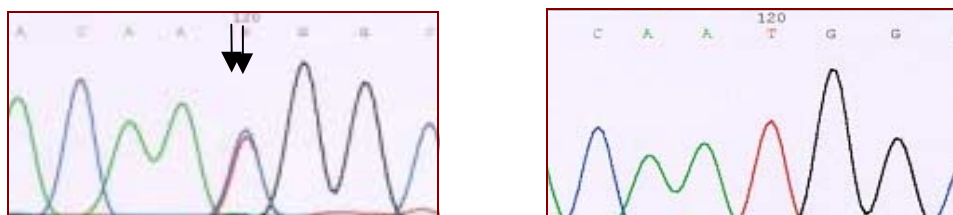
3.14.2.5 – Colocamos a solução de luciferina dentro do Luminômetro (Auto Lumat LB 953 EGEG Berthold) para iniciar a leitura por 30 segundos.

4 – RESULTADOS

4.1 – Seqüenciamento

Na hipoplasia e hipertireotropinemia, pesquisamos mutações nos dez exons do gene do receptor do hormônio estimulante da tireóide (*rTSH*), porém não encontramos mutações.

Devido ao grande número de pacientes com o fenótipo de hipoplasia tireoidiana, selecionamos 20 destes pacientes, de acordo com a ultra-sonografia, para o seqüenciamento dos 10 exons do *rTSH*. Para os casos de hipertireotropinemia, escolhemos 10 pacientes, onde o valor do TSH apresentou-se extremamente elevado. Nestes pacientes, encontramos o polimorfismo no exon 7, no codon 187 que codifica para o aminoácido asparagina, descrito por De Roux *et al.* (1996) (58). Ainda, 11 pacientes foram homozigotos para AAT (seta B), seis pacientes foram homozigotos para AAC (seta C), 13 pacientes foram heterozigotos para AAT/AAC, apresentando dois picos (seta em A), um da timina e outro da citosina (Figura 7).



A. Paciente heterozigoto para 561T>C. **B.** Paciente homozigoto para 561T.



C. Paciente homozigoto para 561C.

Figura 7. Cromatogramas da região polimórfica da seqüência “sense” do exon 7 do gene do receptor do hormônio estimulante da tireóide (*rTSH*) em pacientes com hipoplasia, mostrando o sítio polimórfico 561T>C.

Para o gene *PAX8*, amplificamos os exons 1 ao 10 e sua região promotora. Amplificamos essas regiões do DNA extraído dos 30 pacientes de Belo Horizonte com diagnóstico morfológico de agenesia (13 pacientes) e de ectopia (17 pacientes), e também o DNA extraído de duas glândulas ectópicas de pacientes de Botucatu e de São Paulo.

Ao seqüenciarmos o exon 1 do *PAX8*, nos pacientes JSB (SPA – 128) e FFC (SPA – 147), ambos com ectopia tireoidiana, encontramos uma alteração heterozigótica na posição -465 G>C de acordo com a numeração relativa ao ATG localizado no exon 2, como mostra a Figura 8.

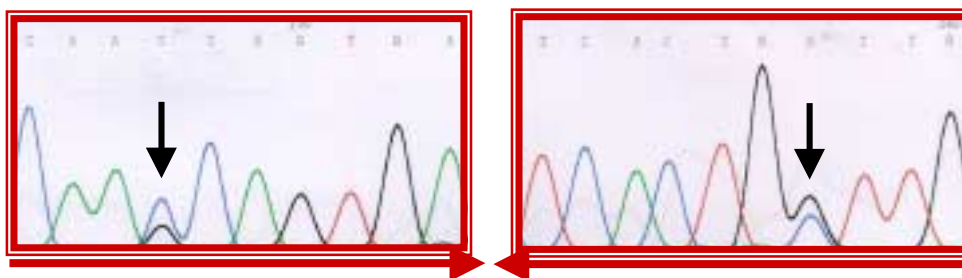


Figura 8. Parte do cromatograma das seqüências “sense” e “anti-sense” do exon 1 do *PAX8* dos pacientes com ectopia tireoidiana mostrando a alteração -465 G>C

Nos mesmos pacientes acima, foi identificada uma outra alteração heterozigótica na região promotora do *PAX8*. Na posição -983, foi observado uma transição C>T de acordo com a numeração relativa ao ATG localizado no exon 2, como mostra a Figura 9.

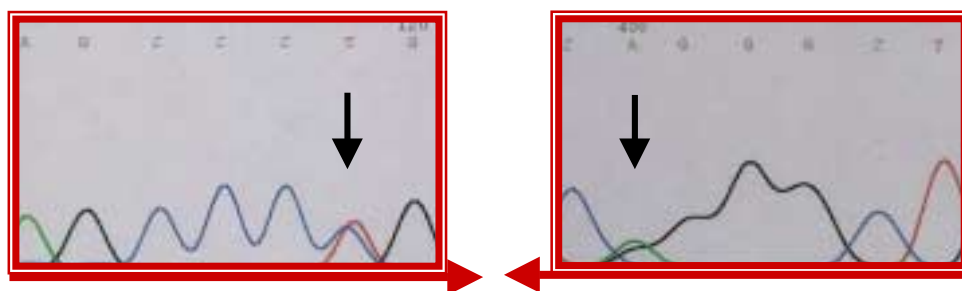


Figura 9. Parte do cromatograma das seqüências “sense” e “anti-sense” da região promotora do *PAX8* dos pacientes com ectopia tireoidiana mostrando a alteração -983 C>T.

Após o seqüenciamento da região promotora e do exon 1 dos familiares dos pacientes JSB e FFC, encontramos, no pai do paciente JSB, as mesmas alterações heterozigóticas observadas no filho.

Os outros 30 pacientes analisados não apresentaram nenhuma alteração nas regiões seqüenciadas.

4.2 – Genotipagem

Realizamos a técnica da genotipagem nos pacientes JSB e seus familiares (Figura 10), e FFC e na sua mãe (Figura 11). Como não dispúnhamos do material genético do pai da paciente FFC, por meio da genotipagem desta última, foi possível identificarmos um dos alelos de seu pai. Esta técnica nos permitiu analisar microssatélites polimórficos. A análise foi realizada em um seqüenciador ABI Prism 377, utilizando o programa “GeneScan”. Os marcadores D2S165, D2S367, D2S286, D2S139, D2S160, D2S142, D2S364, D2S117, D2S325, D2S126, D2S125, os quais estão localizados ao longo do cromossomo 2, foram utilizados para o rastreamento deste cromossomo.

Baseado na análise de marcadores DNA polimórficos, parece improvável que os dois pacientes sejam relacionados, pois, de acordo com os resultados da genotipagem, figuras 10 e 11, os dois pacientes mostram somente três marcadores em comum, a alteração -983 C>T e a alteração -465 G>C, identificadas anteriormente por meio do seqüenciamento, e o marcador D2S165, identificado por meio da genotipagem.

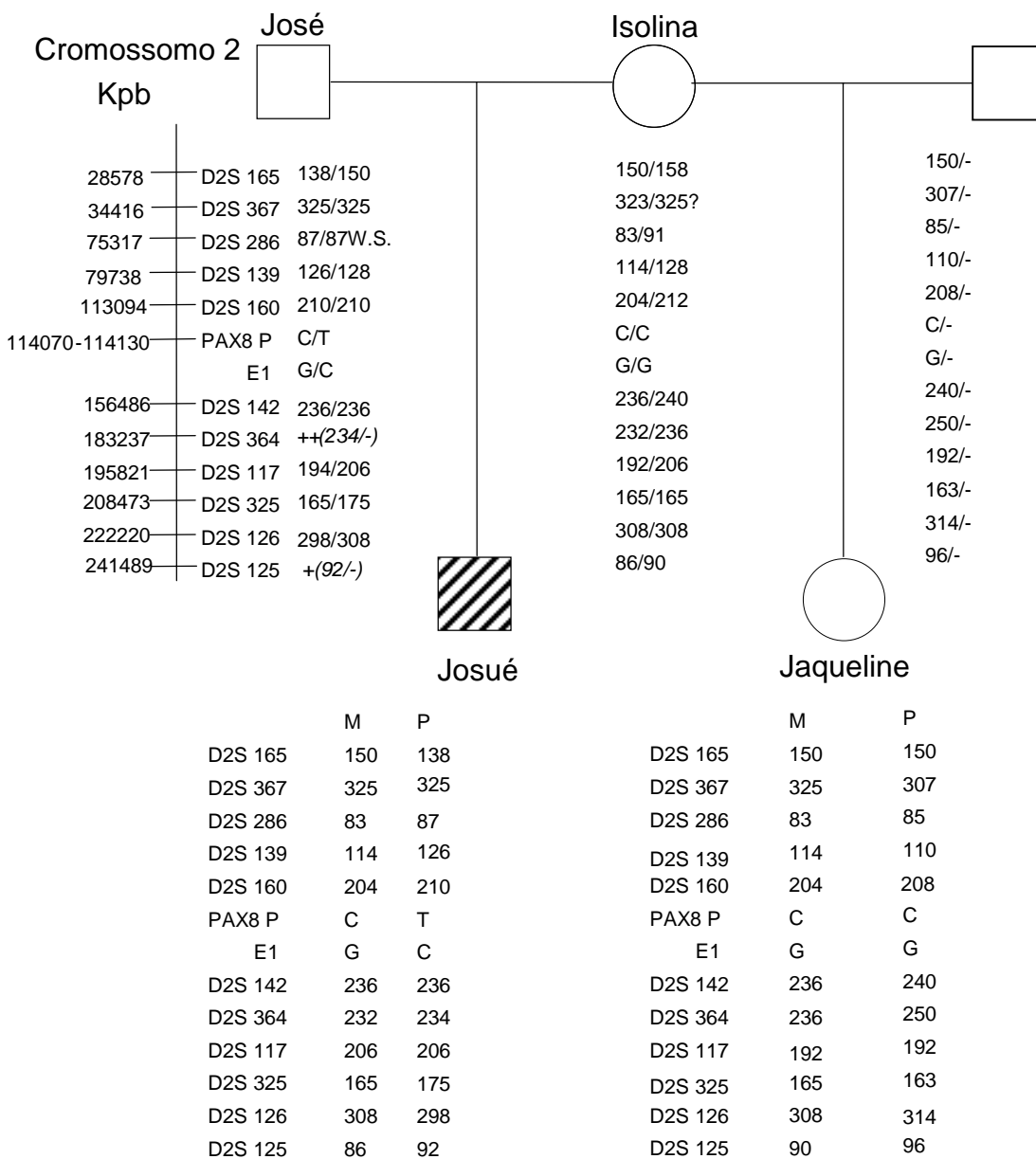
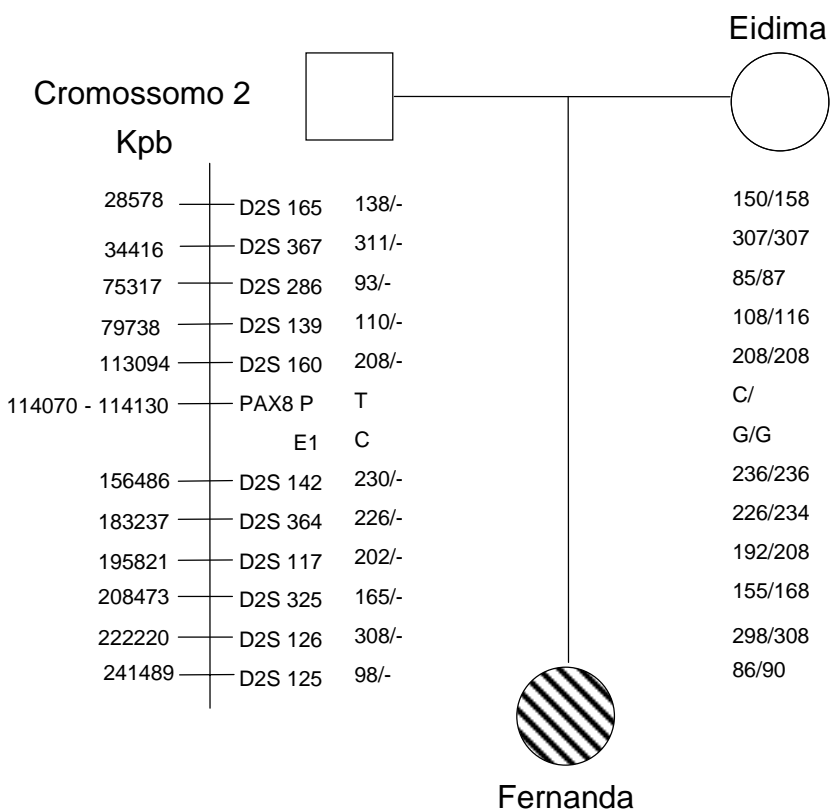


Figura 10. Genotipagem do paciente SPA – 128 e de sua família



	M	P
D2S 165	158	138
D2S 367	307	311
D2S 286	85	93
D2S 139	108	110
D2S 160	208	208
PAX8 P	C	T
E1	G	C
D2S 142	236	230
D2S 364	226	226
D2S 117	208	202
D2S 325	165	165
D2S 126	308	308
D2S 125	88	98

Figura 11. Genotipagem do paciente SPA – 147 e de sua família

4.3 – Dados clínicos dos pacientes com alterações no *PAX8*

Como mostramos acima, duas crianças com tireóide ectópica foram identificadas por apresentarem as mesmas alterações na seqüência do *PAX8*, -983 C>T e -465 G>C (Figuras 8 e 9). Elas não são consangüíneas e provavelmente não relacionadas. A disgenesia tireoidiana foi detectada no “screening” neonatal, pelo Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD), localizado na Universidade Federal de Belo Horizonte, Minas Gerais. Nenhum outro membro das famílias de ambas as crianças apresentou hipotireoidismo e outras malformações.

4.3.1 - Paciente 1 (SPA – 128)

JSB, sexo masculino, ao nascer, apresentou o TSH de 289,3 µUI/ml (valor de referência 0,5 – 5 µUI/ml), o T4 livre de 0,5 ng/dl (valor de referência 0,8 – 1,9 ng/dl) e o T4 total de 4,3 µg/dl (valor de referência 8,0 – 16,0 µg/dl). Aos 3 anos de idade, foi retirada a levotiroxina por 8 semanas e feita nova dosagem bioquímica para confirmar o diagnóstico: o nível de TSH foi de 16,4 µUI/ml, o de T4 livre de 1,4 ng/dl e o da tireoglobulina de 34,4 ng/ml (valor de referência 30,0 – 60,0 ng/ml).

A ultra-sonografia da tireóide mostrou uma glândula em posição pouco superior a habitual, no terço médio cervical, volume normal, forma anatômica e contornos regulares, parênquima com textura homogênea e ecogenicidade normal. O tireograma com iodo¹³¹ mostrou uma glândula com distribuição homogênea e o teste do perclorato apresentou uma queda de 6,9% (valor de referência < 20%).

4.3.2 - Paciente 2 (SPA – 147)

FFC, sexo feminino, ao nascer, apresentou o TSH de 244,00 μ UI/ml (valor de referência 0,5 – 5 μ UI/ml), o T4 livre de 0,5 ng/dl (valor de referência 0,8 – 1,9 ng/dl) e o T4 total de 2,9 μ g/dl (valor de referência 8,0 – 16,0 μ g/dl). Aos 3 anos de idade, foi retirada a levotiroxina por 8 semanas e feita nova dosagem bioquímica para confirmar o diagnóstico: o nível de TSH foi de 273,0 μ UI/ml, o de T4 livre de 0,2 ng/dl e o da tireoglobulina de 80,9 ng/ml (valor de referência 30 – 60 ng/ml).

A ultra-sonografia da tireóide mostrou uma glândula em posição pouco superior a habitual, no terço médio cervical, volume diminuído, forma anatômica e contornos regulares, parênquima com textura homogênea e ecogenicidade aumentada. O tireograma com iodo¹³¹ apresentou um tecido iodo captante na região submentoniana e o teste do perclorato apresentou uma queda de 18,2% (valor de referência < 20%).

4.4 – Resultados dos ensaios de transfecção e de atividade de transcrição

As alterações identificadas na região promotora (P) e no exon 1 (E) do *PAX8* foram analisadas quanto ao seu caráter funcional por meio do ensaio de luciferase. Com o uso desta técnica, pudemos, também, avaliar se a atividade do promotor era diferente entre o nativo e o mutante na presença de TSH. Para este fim, tratamos as células transfectadas com e sem TSH no meio de cultura. A figura 12 ilustra os resultados. O vetor pGL3 básico, sem o promotor, o qual foi utilizado como controle, não apresentou qualquer

atividade significativa. O pGL3 clonado com o fragmento nativo apresentou atividade significativa, confirmando a presença de um promotor funcional. Esta atividade aumentou depois da adição de TSH, demonstrando uma regulação pelo cAMP. Os clones (PE e P), na ausência de TSH, apresentaram níveis basais de atividade que não diferiram do nativo. Em contraste, entretanto, ambos os clones apresentaram uma resposta ao TSH diminuída em comparação com a do nativo, sugerindo que essas alterações reduzam a resposta transcricional induzida por cAMP.

O clone E apresentou níveis de atividade basal que não diferiram do nativo, nem na presença de TSH nem na sua ausência. Isto nos leva a concluir que a alteração no exon 1 (E) não tem influência no fenótipo destes pacientes. Quando associada à alteração no promotor (PE), a responsável pela diminuição da resposta na presença de TSH é somente a alteração P.

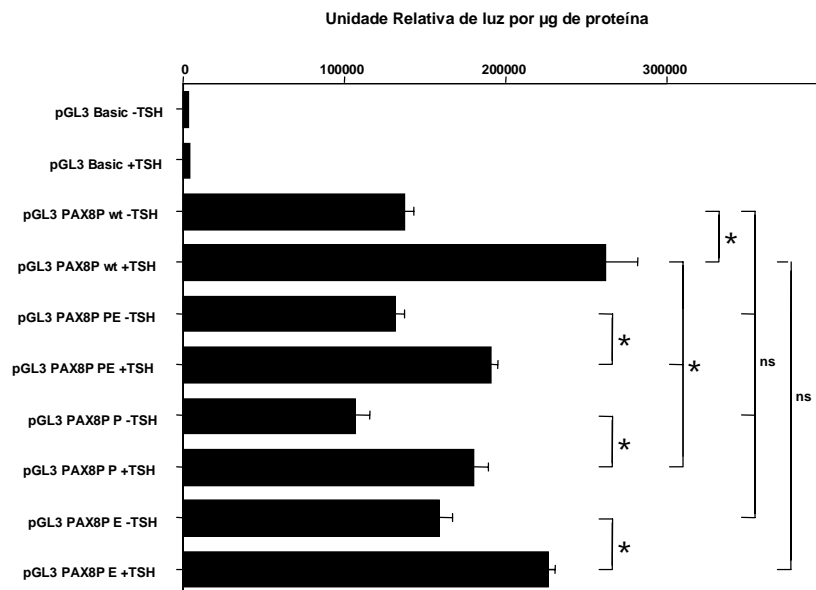


Figura 12. Ensaio de luciferase, medindo a atividade do promotor *PAX8*, nativo e mutante, na ausência e na presença de estímulo com TSH. Os valores foram obtidos em triplicata. A figura mostra as médias \pm epm (erro padrão da média). Os grupos foram comparados com a técnica da análise de variância para o modelo com dois fatores (“two-way ANOVA test”).

5 – DISCUSSÃO

Hipotireoidismo congênito é uma doença relativamente freqüente. Em regiões iodo-suficientes, ela afeta aproximadamente 1 em 4.000 recém-nascidos, sendo uma das principais causas de retardo mental (5, 6). A causa mais comum do HC transitório é a deficiência de iodo. Nos países iodados-suficientes, 85% dos casos de HC são devidos à DT, decorrente de defeitos embriológicos. A DT, inclui agenesia, ectopia e hipoplasia da glândula tireoidiana (8-11, 13, 14).

O gene *PAX8* é um candidato para explicar defeito em pacientes com agenesia e ectopia tireoidiana, já que está envolvido na regulação dos passos iniciais do desenvolvimento de órgãos, definindo a especificação celular regional (48). Além disso, mutações no *PAX8* têm sido encontradas em poucos casos esporádicos e familiares de DT (1-4).

A causa da DT está apenas parcialmente esclarecida. Na grande maioria dos casos, a DT é esporádica, mas, em aproximadamente 2%, é familiar (15, 16).

Considerando-se que a causa da DT ainda esteja somente parcialmente elucidada e que haja vários aspectos contrastantes, podem ser advogados vários mecanismos genéticos para explicar a patogênese do HC. No primeiro, a disgenesia ocorreria em consequência de mutações nos genes envolvidos na embriogênese tireoidiana (*TTF1*, *TTF2* e *PAX8*) (1, 4, 25, 29, 47, 61). No segundo, a disgenesia seria um distúrbio genético complexo onde vários genes colaboram para produzir o fenótipo, talvez em

combinação com fatores ambientais, por uma etiologia poligênica ou multifatorial (1, 10, 11, 13, 14).

Segundo Delange (8), somente uma pequena percentagem, aproximadamente 5%, dos casos de disgenesia tireoidiana é devida ao tamanho reduzido da glândula tireóide, sendo diagnosticada como hipoplasia. Porém, na nossa casuística, a maior percentagem é de pacientes com hipoplasia da glândula. Isto provavelmente é devido ao rigor com que a Equipe do NUPAD vem avaliando os pacientes, com o uso da ultrasonografia e da cintilografia.

O gene do receptor de TSH foi estudado em 20 pacientes com diagnóstico de hipoplasia e em 10 pacientes com hipertireotropinemia tireoidiana. Mutações neste receptor que resultam na perda de sua função não são importantes para o desenvolvimento precoce e migração da tireóide, (52, 54, 62) mas afetam negativamente a diferenciação total e a função da glândula. Observamos, na literatura, que não existe um “hot spot” no gene do receptor de TSH para mutações com perda de função (28, 51, 53, 56, 63-67). Por isso, seqüenciamos todos os exons do gene desse receptor nos 20 pacientes com hipoplasia e nos 10 pacientes com hipertireotropinemia.

O polimorfismo por nós identificado no exon 7 do gene do rTSH (Figura 7), para os casos de hipoplasia e hipertireotropinemia, já havia sido identificado em 1996 por De Roux *et al.* (58). Eles seqüenciaram o gene do rTSH em 15 pacientes, encontraram, em 60% desses pacientes, a asparagina 187 (exon 7) codificada pelo códon AAT e, em 40% dos pacientes, pelo códon AAC. Esta freqüência se confirmou nos nossos

resultados, pois observamos que, em 43,3%, há heterozigose, em 36,7%, a asparagina é codificada por AAT e, em 20%, a asparagina é codificada por AAC. Entretanto, não encontramos quaisquer outras alterações na região codificadora do *rTSH*. Mesmo se excluindo mutações em regiões regulatórias ou intrônicas, pois não estudamos estas regiões, isto sugere que mutações no *rTSH* raramente sejam a causa da hipoplasia tireoidiana (55).

Os genes *PAX* codificam uma família de fatores transcricionais que são essencialmente necessários para a formação de vários tecidos de todas as linhagens germinativas nos embriões de mamíferos. Especificamente, na organogênese, eles estão envolvidos no desencadeamento precoce de eventos de diferenciação celular. Na glândula tireóide, o *PAX8* é essencial para a formação de células foliculares produtoras de tiroxina, as quais são de origem endodermal (49). Além disso, o *PAX8* está envolvido na expressão dos genes da tireoperoxidase (TPO), da tireoglobulina (TG) e na expressão do NIS (46, 68).

Foram seqüenciados os exons dos 19 pacientes com ectopia e os exons dos 13 pacientes com agenesia. Encontramos duas alterações em dois pacientes com ectopia (JSB e FFC), uma no exon 1 e a outra na região promotora deste gene (Figuras 7 e 8). Em todos os outros pacientes, a região seqüenciada do *PAX8* correspondeu à seqüência normal publicada.

Realizamos a técnica da genotipagem nesses pacientes e nos seus familiares, já que eles apresentaram dois alelos iguais e muito próximos entre si. Isso poderia indicar um ancestral comum, porém, pela

técnica da genotipagem, estes pacientes apresentaram apenas mais um alelo em comum, sugerindo que seja improvável que estes dois indivíduos tenham um ancestral comum.

Estas alterações foram investigadas quanto as suas funcionalidades pelo ensaio de Luciferase. Para isso, em primeiro lugar, obtivemos 4 clones luciferase repórteres (Figura 5) que foram testados em células FRTL-5 transfectadas com os mesmos. Com o ensaio de luciferase (Figura 12), pudemos ver que o promotor nativo subclonado no vetor pGL3 apresentou atividade significativa, quando comparado com o pGL3 Basic, usado como controle, confirmando a presença de um promotor funcional. Esta atividade aumentou depois da adição de TSH, demonstrando que o promotor é regulado pelo cAMP. Os construtos mutantes (PE e P) apresentaram níveis basais de atividade que não diferem do nativo sem TSH. Entretanto, ambos os mutantes apresentaram uma resposta alta com TSH, porém diminuída em comparação com a do nativo nas mesmas condições, sugerindo que a alteração no promotor reduza a resposta transcricional induzida por cAMP. O clone E apresentou níveis de atividade basal que não diferiram do nativo, nem na presença de TSH e nem na sua ausência, mostrando que a alteração no exon 1 (E) não tem influência no fenótipo destes pacientes e que, quando associada à alteração no promotor (PE), a responsável pela diminuição da resposta na presença de TSH é somente a alteração P.

6 – CONCLUSÕES

Concluimos que mutações nos genes *rTSH* e *PAX8* não são causas frequentes de disgenesia tireoidiana. Mutações em regiões regulatórias ou intrônicas poderiam, entretanto, ainda estar presentes em um subgrupo destes casos. Além disso, com exceção de dois casos, não pesquisamos mutações somáticas, uma vez que trabalhamos somente com o sangue destes pacientes e não com o tecido.

A mutação -983C>T encontrada no promotor *PAX8* (P) não mudou a atividade basal, mas diminuiu a resposta ao TSH. Isto sugere que a expressão de *PAX8* pudesse estar diminuída nestes pacientes e então contribuir para o fenótipo anormal.

Tem sido reconhecido, entretanto, que estas alterações não são suficientes para explicar o fenótipo anormal e que outras modificações genéticas e/ou ambientais contribuiriam para o desenvolvimento do fenótipo anormal. Isto é também enfatizado pelo fato de que um dos genitores de ambos os pacientes tem o mesmo alelo, porém não apresenta o hipotireoidismo (congênito), um fenômeno também observado em pacientes com mutações no *PAX8*, interrompendo a sua ligação ao DNA e à transativação. Além disso, as alterações funcionais são relativamente modestas. Estas observações suportariam um modelo de DT que possa ter uma base poligênica ou multifatorial.

7 – FUTURAS DIREÇÕES

Estamos analisando se as alterações observadas ocorrem na população em geral. Para isto, estamos seqüenciando o promotor *PAX8* e o exon 1 em 50 indivíduos (correspondendo a 100 cromossomos) da mesma região geográfica. Em seguida, realizaremos experimentos de gel “shift” para sabermos se há alguma proteína que se liga nesta região clonada e que poderia contribuir para a regulação da expressão do gene *PAX8*. Depois, será de interesse identificar um eventual fator que interaja com este sítio e caracterizá-lo na regulação pelo cAMP.

Este estudo, também, foi um ponto de partida para a caracterização do promotor *PAX8*, o qual não tem sido estudado ainda. O importante foi que clonamos um promotor ativo, mas não temos ainda definido o promotor mínimo que confira expressão tecido-específica.

Por último, porém não menos importante, temos estabelecido uma coorte bem caracterizada de crianças com HC devido à DT. Embora este estudo tenha revelado somente alterações na seqüência em duas das 62 crianças estudadas, no futuro, teremos a oportunidade única de caracterizar outros genes candidatos que possam estar envolvidos na patogênese da DT. Tentaremos, também, obter tecidos tireoidianos de alguns dos pacientes estudados a fim de pesquisarmos mutações somáticas nos genes *PAX8*, *TTF1* e *TTF2*.

8 – ANEXOS

Anexo A. Avaliação laboratorial após a interrupção do tratamento dos pacientes com hipoplasia da tireóide

SPA	TSH (μ UI/mL)	T4 livre (ng/dL)	Tireoglobulina (ng/dL)
1	16,2	1,1	46,2
13	23,7	1,2	73,0
17	12,3	1,2	45,7
18	149,1	0,6	66,4
22	15,9	1,2	32,6
26	10,7	1,1	36,0
27	16,8	0,8	61,0
29	7,3	1,4	58,2
31	8,7	1,2	37,1
32	96,1	1,3	20,6
38	19,0	1,3	33,1
40	7,6	1,2	23,3
43	14,4	1,1	61,1
53	10,9	1,6	39,4
56	30,6	1,2	77,5
60	26,1	1,2	28,5
79	8,0	1,0	12,3
85	6,8	1,1	29,4

Anexo A. Avaliação laboratorial após a interrupção do tratamento dos pacientes com hipoplasia da tireóide “continuação”

SPA	TSH (μ UI/mL)	T4 livre (ng/dL)	Tireoglobulina (ng/dL)
87	8,7	1,2	42,5
91	17,7	1,2	37,5
103	17,2	1,0	38,2
108	7,5	1,0	25,6
109	9,2	1,1	50,1
110	6,1	1,0	38,3
114	13,7	1,1	24,7
115	6,1	1,2	20,3
117	37,3	1,1	23,7
122	10,5	1,1	27,5
123	11,0	1,3	30,4
124	10,0	1,3	33,3
126	6,2	1,2	53,3
132	310,1	0,3	24,1
133	4,5	1,2	24,2
135	9,6	1,1	35,0
144	7,0	1,2	56,8
149	6,0	1,0	37,7
155	30,9	1,4	39,5

Anexo A. Avaliação laboratorial após a interrupção do tratamento dos pacientes com hipoplasia da tireóide “continuação”

SPA	TSH (μ UI/mL)	T4 livre (ng/dL)	Tireoglobulina (ng/dL)
157	5,6	1,2	33,5
158	5,1	1,0	31,2
160	15,7	1,0	19,2
164	6,5	1,1	71,0
166	8,6	1,0	18,8
170	13,2	1,1	61,6
175	395,8	0,2	26,0
179	371,8	0,4	28,6
183	6,6	1,0	28,3
185	8,2	1,1	24,5
187	19,5	1,3	14,1
191	10,9	1,2	46,7
192	15,6	1,3	19,8
201	34,6	0,8	59,8
208	3,2	0,9	29,8
210	10,0	1,3	55,5
216	8,6	1,3	34,6
220	88,9	0,8	8,7

Anexo B. Avaliação laboratorial após a interrupção do tratamento dos pacientes com hipertireotropinemia

SPA	TSH (μ UI/mL)	T4 livre (ng/dL)	Tireoglobulina (ng/dL)
2	34,8	0,9	21,9
5	54,0	0,9	196,6
6	492,0	0,2	-
15	5,3	1,1	51,5
28	8,5	1,2	18,9
34	4,2	1,1	29,1
36	13,8	1,2	33,2
39	9,9	0,9	29,0
41	8,1	1,3	20,6
42	13,8	1,1	44,6
84	23,4	1,3	29,5
86	759,1	0,2	0,1
89	8,5	0,8	21,2
95	461,1	0,2	1,8
97	14,9	1,2	96,5
99	18,9	1,1	74,1
105	27,3	1,2	19,5
107	31,2	0,9	47,7
156	18,8	1,2	40,6
161	14,0	0,9	72,7

Anexo B. Avaliação laboratorial após a interrupção do tratamento dos pacientes com hipertireotropinemia “continuação”

SPA	TSH (μ UI/mL)	T4 livre (ng/dL)	Tireoglobulina (ng/dL)
168	7,3	1,0	45,4
173	22,7	1,0	178,9
184	142,0	0,4	20,0
193	10,3	1,3	-
200	4,5	1,4	21,3

Anexo C. Avaliação laboratorial após a interrupção do tratamento dos pacientes com ectopia da tireóide

SPA	TSH (μ UI/mL)	T4 livre (ng/dL)	Tireoglobulina (ng/dL)
74	256,7	0,4	39,4
90	10,8	1,3	72,7
104	751,6	0,3	122,9
116	346,5	0,2	75,9
121	230,3	0,4	47,0
127	24,9	0,9	105,4
128	16,4	1,4	34,4
141	328,3	0,4	20,4
147	273,0	0,2	80,9
148	986,5	0,3	53,4
171	171,0	0,2	21,9
172	40,2	0,3	110,0
174	4,4	1,5	60,3
180	4,8	1,2	62,2
186	330,0	0,3	65,3
195	227,4	0,5	81,6
203	304,0	0,8	634,5

Anexo D. Avaliação laboratorial após a interrupção do tratamento dos pacientes com agenesia da tireóide

SPA	TSH (μ UI/mL)	T4 livre (ng/dL)	Tireoglobulina (ng/dL)
55	374,1	0,2	27,0
129	932,6	0,1	10,9
134	269,6	0,1	6,1
138	859,6	0,1	2,2
142	435,7	0,4	24,6
159	198,3	0,3	5,7
162	30,0	0,8	40,7
163	993,5	0,2	3,5
190	388,1	0,1	0,1
204	682,4	0,1	11,2
205	680,3	0,2	114,3
213	455,5	0,2	5,6
217	148,6	0,7	96,8

Tabela 3. Sequência dos “primers” utilizados para amplificar os exons do gene *rTSH*

Exon	Sequência
1F	GAGGATGGAGAAATAGCCCCG AG
1R	CACTACTTCGGGCTGTTATTGAG
2F	TTAGGTGAATTATTAGAAAAGC
2R	CTTGATAGAACAAGTTTAGAGAA
3F	GCAGAATCCATGAGGGTTGT
3R	AGAAACCAGGCCTCCCATTG
4F	ACCCTGTGGCGTAAATGCATAT
4R	CCCGACCCAGGCTATACACCATT
5F	GCTTTACTTATCTTCAACCTACC
5R	AGTTTGACTACAGGTTGTCTTC
6F	TATTGTGTCCTGTTATTTAAGTGCATA
6R	GTACTCTATAGAGTATATATGATAAGG
7F	TGGGATACATATGTGGGACCTG
7R	TGTTGGGTCACACTAACTCTGG
8F	TGGTCACATTTTATTCTGATATTTGT
8R	CTCCCCTTAATGTCTCCATTTATTCC
9F	TCATCTCCCAATTAACCTCAGG
9R	GCTTCCAATTTCTCTCCAC
10.1F	ACTGTCTTTGCAAGCGAGTT
10.2R	GTGTCATGGGATTGGAATGC
10.3F	TGGCACTGACTCTTTTCTGT
10.4R	GTCCATGGGCAGGCAGATAC

Tabela 4. Seqüência dos “primers” utilizados para amplificar os exons do *PAX8*

Exon	Seqüência
PF	GTGACAATTTTGTAGCCTG
PR	CGGTTTTATCCCGCTGAGG
1F	CTGAGTCCACTCAGCCATGTC

1R	CAACCTCAGCCTAGCCTAG
2F	GCACTCCCAATCCTTGATC
2R	CTCGGGGACCTGACCACACC
3F	CATAGCTAATCCCCACCCAAAC
3R	GCCTGCGGTGAATTTTCGT
4F	ATTGGGTAATTCTTTGGGATTC
4R	CCAGGCCTTTCTTGTCTCTT
5F	AGGGGTGTCAAAAAGGCGACTG
5R	TGGGTATGCTGAAGGGGAGGTG
6F	TCTCCCTCTCCCCACTG
6R	GCAGAGCCCCTACAAAGTCC
7F	GAGCATGAATGATAGGTCCC
7R	CACGGCTCATTGGAGAAT
8F	GTCTCTGTGCGCTGACTTCT
8R	CACACCTTCCGCCTGAC
9F	CCTCCCCGCCATCTCACACC
9R	TCCCACCCGCCGCCATAG
10F	GCCCCCATGGTCCAACCTGAC
10R	TGCCTCTGCTCCTTGTGTCCAC

9 – REFERÊNCIAS

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

2. Vilain C, Rydlewski C, Duprez L, Heinrichs C, Abramowicz M, Malvaux P, Renneboog B, Parma J, Costagliola S, Vassart G.. Autosomal dominant transmission of congenital thyroid hypoplasia due to loss-of-function mutation of PAX8. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:234-8.
3. Komatsu M, Takahashi T, Takahashi I, Nakamura M, Takada G. Thyroid dysgenesis caused by PAX8 mutation: the hypermutability with CpG dinucleotides at codon 31. *J Pediatr* 2001;139:597-9.
4. Macchia PE, Lapi P, Krude H, Pirro MT, Missero C, Chiovato L, Souabni A, Baserga M, Tassi V, Pinchera A, Fenzi G, Gruters A, Busslinger M, Di Lauro R. PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nat Genet* 1998;19:83-6.
5. New England Congenital Hypothyroidism Collaborative. Effects of neonatal screening for hypothyroidism: prevention of mental retardation by treatment before clinical manifestation. *Lancet* 1981;2:1095-8.
6. Toublanc JE. Comparison of epidemiological data on congenital hypothyroidism in Europe with those of other parts in the world. *Horm Res* 1992;138:230-5.
7. Brook CGD. The consequences of congenital hypothyroidism. *Clin Endocrinol* 1995;42:431-2.
8. Delange F. Neonatal hypothyroidism: recent developments. Baillieres *Clin Endocrinol Metab* 1988;2:637-52.
9. Klett M. Epidemiology of congenital hypothyroidism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997;105 Suppl 4:19-23.

10. Gillam MP, Kopp P. Genetic regulation of thyroid development. *Current Opinion Pediatrics* 2001;13:358-63.
11. Knobel M, Medeiros-Neto G. An outline of inherited disorders of the thyroid hormone generating system. *Thyroid* 2003;13:771-801.
12. Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, Vulsma T, Ris-Stalpers C. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med* 2002;347:95-102.
13. Van Vliet G. Development of the thyroid gland: lessons from congenitally hypothyroid mice and men. *Clin Genet* 2003;63:445-55.
14. Moreno JC, de Vijlder JJ, Vulsma T, Ris-Stalpers C. Genetic basis of hypothyroidism: recent advances, gaps and strategies for future research. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:318-26.
15. Vulsma T, Vijlder J. Thyroid disease in newborns, infants and children. In: Wass J, Shalet S, editors. *Endocrinology and diabetes*. Oxford: University Press; 2002. p. 532-44.
16. Castanet M, Lyonnet S, Bonaiti-Pellie C, Polak M, Czernichow P, Leger J. Familial forms of thyroid dysgenesis among infants with congenital hypothyroidism. *N Engl J Med* 2000;343:441-2.
17. Devos H, Rodd C, Gagne N, Laframboise R, Van Vliet G. A search for the possible molecular mechanisms of thyroid dysgenesis: sex ratios and associated malformations. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2502-6.
18. Castanet M, Polak M, Bonaiti-Pellie C, Lyonnet S, Czernichow P, Leger J. Nineteen years of national screening for congenital hypothyroidism:

- familial cases with thyroid dysgenesis suggest the involvement of genetic factors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2009-14.
19. Moreno JC. Identification of novel genes involved in congenital hypothyroidism using serial analysis of gene expression. *Horm Res* 2003;60 Suppl 3:96-102.
 20. Lazarus JH, Hughes IA. Congenital abnormalities and congenital hypothyroidism. *Lancet* 1988;2:52.
 21. Stoll C, Dott B, Alembik Y, Koehl C. Congenital anomalies associated with congenital hypothyroidism. *Ann Genet* 1999;42:17-20.
 22. Siebner R, Merlob P, Kaiserman I, Sack J. Congenital anomalies concomitant with persistent primary congenital hypothyroidism. *Am J Med Genet* 1992;44:57-60.
 23. Roberts HE, Moore CA, Fernhoff PM, Brown AL, Khoury MJ. Population study of congenital hypothyroidism and associated birth defects, Atlanta, 1979-1992. *Am J Med Genet* 1997;71:29-32.
 24. Beamer WG, Eicher EM, Maltais LJ, Southard JL. Inherited primary hypothyroidism in mice. *Science* 1981;212:61-2.
 25. Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, Gonzalez FJ. The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev* 1996;10:60-9.
 26. Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P, Crisp MS, John R, Lazarus JH, Ludgate M, Chatterjee VK. Mutation of the gene encoding human TTF-2

- associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat Genet* 1998;19:399-401.
27. De Felice M, Ovitt C, Biffali E, Rodriguez-Mallon A, Arra C, Anastassiadis K, Macchia PE, Mattei MG, Mariano A, Scholer H, Macchia V, Di Lauro R. A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet* 1998;19:395-8.
28. Abramowicz MJ, Duprez L, Parma J, Vassart G, Heinrichs C. Familial congenital hypothyroidism due to inactivating mutation of the thyrotropin receptor causing profound hypoplasia of the thyroid gland. *J Clin Invest* 1997;99:3018-24.
29. Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P. Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nature Genet* 1998;19:87-90.
30. Grant DB, Smith I. Survey of neonatal screening for primary hypothyroidism in England, Wales, and Northern Ireland 1982-4. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1988;296:1355-8.
31. Perry R, Heinrichs C, Bourdoux P, Khoury K, Szots F, Dussault JH, Vassart G, Van Vliet G. Discordance of monozygotic twins for thyroid dysgenesis: implications for screening and for molecular pathophysiology. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4072-7.
32. Pohlenz J, Dumitrescu A, Zundel D, Martine U, Schonberger W, Koo E, Weiss RE, Cohen RN, Kimura S, Refetoff S. Partial deficiency of thyroid transcription factor 1 produces predominantly neurological defects in humans and mice. *J Clin Invest* 2002;109:469-73.

33. Krude H, Schutz B, Biebermann H, von Moers A, Schnabel D, Neitzel H, Tonnies H, Weise D, Lafferty A, Schwarz S, DeFelice M, von Deimling A, van Landeghem F, DiLauro R, Gruters A. Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency. *J Clin Invest* 2002;109:475-80.
34. Zannini M, Avantaggiato V, Biffali E, Arnone MI, Sato K, Pischetola M, Taylor BA, Phillips SJ, Simeone A, Di Lauro R. TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *EMBO J* 1997;16:185-97.
35. Castanet M, Park SM, Smith A, Bost M, Leger J, Lyonnet S, Pelet A, Czernichow P, Chatterjee K, Polak M. A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate. *Hum Mol Genet* 2002;11:2051-9.
36. Damante G, Tell G, Di Lauro R. A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001;66:307-56.
37. Hamdan H, Liu H, Li C, Jones C, Lee M, deLemos R, Minoo P. Structure of the human Nkx2.1 gene. *Biochim Biophys Acta* 1998;1396:336-48.
38. Perna MG, Civitareale D, De Filippis V, Sacco M, Cisternino C, Tassi V. Absence of mutations in the gene encoding thyroid transcription factor-1 (TTF-1) in patients with thyroid dysgenesis. *Thyroid* 1997;7:377-81.
39. Lapi P, Macchia PE, Chiovato L, Biffali E, Moschini L, Larizza D, Baserga M, Pinchera A, Fenzi G, Di Lauro R. Mutations in the gene encoding

- thyroid transcription factor-1 (TTF-1) are not a frequent cause of congenital hypothyroidism (CH) with thyroid dysgenesis. *Thyroid* 1997;7:383-7.
40. Hishinuma A, Kuribayashi T, Kanno Y, Onigata K, Nagashima K, Ieiri T. Sequence analysis of thyroid transcription factor-1 gene reveals absence of mutations in patients with thyroid dysgenesis but presence of polymorphisms in the 5' flanking region and intron. *Endocr J* 1998;45:563-7.
41. Devriendt K, Vanhole C, Matthis G, De Zegher F. Deletion of thyroid transcription factor-1 gene in an infant with neonatal thyroid dysfunction and respiratory failure. *New Engl J Med* 1998;338:1317-8.
42. Iwatani N, Mabe H, Devriendt K, Kodama M, Miike T. Deletion of NKX2.1 gene encoding thyroid transcription factor-1 in two siblings with hypothyroidism and respiratory failure. *J Pediatr* 2000;137:272-6.
43. Chadwick BP, Obermayr F, Frischauf AM. FKHL15, a new human member of the forkhead gene family located on chromosome 9q22. *Genomics* 1997;41:390-6.
44. Bamforth JS, Hughes IA, Lazarus JH, Weaver CM, Harper PS. Congenital hypothyroidism, spiky hair, and cleft palate. *J Med Genet* 1989;26:49-51.
45. Damante G, Di Lauro R. Thyroid-specific gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1994;1218:255-66.
46. Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev* 2003;24:48-77.

47. Poleev A, Fickenscher H, Mundlos S, Winterpacht A, Zabel B, Fidler A, Gruss P, Plachov D. PAX8, a human paired box gene: isolation and expression in developing thyroid, kidney and Wilms' tumors. *Development* 1992;116:611-23.
48. Strachan T, Read AP. PAX genes. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4:427-38.
49. Mansouri A, St-Onge L, Gruss P. Role of Genes in Endoderm-derived Organs. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10:164-7.
50. Xu HE, Rould MA, Xu W, Epstein JA, Maas RL, Pabo CO. Crystal structure of the human Pax6 paired domain-DNA complex reveals specific roles for the linker region and carboxy-terminal subdomain DNA binding. *Genes Develop* 1999;13:1263-75.
51. De Roux N, Misrahi M, Brauner R, Houang M, Carel JC, Granier M, Le Bouc Y, Ghinea N, Boumedienne A, Toublanc JE, Milgrom E. Four families with loss of function mutations of the thyrotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4229-35.
52. Nogueira CR, Nguyen LQ, Coelho-Neto JR, Karamanoglu Arseven O, Jameson JL, Kopp P, Medeiros-Neto GA. Structural analysis of the thyrotropin receptor in four patients with congenital hypothyroidism due to thyroid hypoplasia. *Thyroid* 1999;9:523-9.
53. Sunthornthepvarakul T, Gottschalk ME, Hayashi Y, Refetoff S. Resistance to thyrotropin caused by mutations in the thyrotropin-receptor gene. *New Engl J Med* 1995;332:155-60.
54. Postiglione MP, Parlato R, Rodriguez-Mallon A, Rosica A, Mithbaokar P, Maresca M, Marians RC, Davies TF, Zannini MS, De Felice M, Di Lauro

- R. Role of the thyroid-stimulating hormone receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15462-7.
55. Kopp P. The TSH receptor and its role in thyroid disease. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:1301-22.
56. Nagashima T, Murakami M, Onigata K, Morimura T, Nagashima K, Mori M, Morikawa A. Novel inactivating missense mutations in the thyrotropin receptor gene in Japanese children with resistance to thyrotropin. *Thyroid* 2001;11:551-9.
57. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
58. De Roux N, Misrahi M, Chatelain N, Gross B, Milgrom E. Microsatellites and PCR primers for genetic studies and genomic sequencing of the human TSH receptor gene. *Mol Cell Endocrinol* 1996;117:253-6.
59. Asubel F, Brent R, Kirgston R, Moore D, Slidman J, Smith S, et al. Current protocols in molecular biology. New York: John Wiley Sons; 1989.
60. Ambesi-Impiombato FS, Villone G. The FRTL-5 thyroid cell strain as a model for studies on thyroid cell growth. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 1987;281:242-5.
61. Pohlenz J, Dumitrescu A, Aumann U, Koch G, Melchior R, Prawitt D, Refetoff S. Congenital secondary hypothyroidism caused by exon skipping due to a homozygous donor splice site mutation in the TSHbeta-subunit gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:336-9.

62. Stein SA, Oates EL, Hall CR, Grumbles RM, Fernandez LM, Taylor NA, Puett D, Jin S Identification of a point mutation in the thyrotropin receptor of the hyt/hyt hypothyroid mouse. *Mol Endocrinol* 1994;8:129-38.
63. Biebermann H, Schöneber T, Krude H, Schultz G, Gudermann T, Grüters A. Mutations of the human thyrotropin receptor gene causing thyroid hypoplasia and persistent congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3471-80.
64. Clifton-Bligh RJ, Gregory JW, Ludgate M, John R, Persani L, Asteria C, Beck-Peccoz P, Chatterjee VK. Two novel mutations in the thyrotropin (TSH) receptor gene in a child with resistance to TSH. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1094-100.
65. Gagne N, Parma J, Deal C, Vassart G, Van Vliet G. Apparent congenital athyreosis contrasting with normal plasma thyroglobulin levels and associated with inactivating mutations in the thyrotropin receptor gene: are athyreosis and ectopic thyroid distinct entities? *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1771-5.
66. Tiosano D, Pannain S, Vassart G, Parma J, Gershoni-Baruch R, Mandel H, Lotan R, Zaharan Y, Pery M, Weiss RE, Refetoff S, Hochberg Z. The hypothyroidism in an inbred kindred with congenital thyroid hormone and glucocorticoid deficiency is due to a mutation producing a truncated thyrotropin receptor. *Thyroid* 1999;9:887-94.
67. Tonacchera M, Agretti P, Pinchera A, Rosellini V, Perri A, Collecchi P, Vitti P, Chiovato L. Congenital hypothyroidism with impaired thyroid response to thyrotropin (TSH) and absent circulating thyroglobulin:

evidence for a new inactivating mutation of the TSH receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1001-8.

68. Zannini M, Francis-Lang H, Plachov D, Di Lauro R. Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. *EMBO J* 1992;12:4230-41.