

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM
HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO DE MONTE SANTO-BAHIA-BRASIL**

TAÍSE LIMA DE OLIVEIRA

**Salvador – Brasil
2010**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM
HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO DE MONTE SANTO-BAHIA-BRASIL**

TAÍSE LIMA DE OLIVEIRA

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Angelina Xavier Acosta

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em
Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa para a
obtenção do grau de Mestre.

**Salvador – Brasil
2010**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, onde tudo começa e termina, pela experiência desta vida.

À minha família, pais e irmãos, amores da minha vida, pelo incentivo e apoio constante.

À Gezer Cerqueira, pelo amor, cuidado, compreensão e principalmente por nunca me permitir pensar em desistir de nada.

Às orientadoras Angelina Acosta e Kiyoko Sandes pela oportunidade e principalmente pelos ensinamentos compartilhados ao longo de todos esses anos.

Ao Dr. Luis Santana e Érick Alves da Universidade do Pará por ceder os *primers* para que iniciássemos o nosso projeto, além de nos prestar auxílio nos momentos de dúvidas.

Ana Cláudia Couto-Silva pelo suporte, atenção, convivência diária e ensinamentos no mundo fantástico da endocrinologia.

Ao grupo Genlasp, obrigada pelos momentos de aprendizagem, mas especialmente pela convivência diária, onde compartilhamos o laboratório e nossas vidas e assim, aos poucos, constituímos laços de carinho e amizade.

Ao grupo Genética no Sertão, essas expedições, embora cansativas, muito mais gratificantes, por nos permitir ver os nossos projetos pelo outro lado e interagir com pessoas de diferentes áreas de conhecimento.

Aos amigos do LASP, pelos intermináveis almoços em grupo, conversas, enfim, pela amizade, incentivo e companheirismo.

Aos amigos do CPqGM, apesar de estarem em outros laboratórios e não convivermos diariamente, a ajuda quando necessário, as palavras de estímulo e o carinho torna cada um muito especial.

À Silvana da Plataforma de Sequenciamento.

À Sidelcina Pacheco, por dividirmos não só a casa, mas as nossas vidas.

Aos meus amigos por entenderem a minha ausência nos momentos mais importantes das suas vidas.

À Fernanda Grassi, coordenadora do LASP.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/FIOCRUZ-BA e ao INAGEMP pelo apoio financeiro.

EPIGRAFE

*“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas que já têm a forma do nosso
corpo...
E esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares...
É o tempo da travessia...
E se não ousarmos fazê-la...
Teremos ficado para sempre à margem de nós mesmos”*

Fernando Pessoa

RESUMO

Introdução: O hipotireoidismo congênito (HC) é uma das doenças metabólicas mais comuns na infância, com incidência de HC é de 1:3.000 a 1:5.000 nascidos-vivos. Quando primário, o HC caracteriza-se por altos níveis de TSH podendo ser originado por disormonogênese, deficiente produção hormonal ou decorre de disgenesia tireoidiana, defeito embriológico que leva a agenesia, hemiagenesia ou ectopia. Na ausência do tratamento hormonal, o HC leva a grave retardo mental, além de outras alterações clínicas. A interação do hormônio TSH com o seu receptor (TSHR) tem importante função biológica estimulando o crescimento, diferenciação e função tireoidiana. Mutações no gene do TSHR têm sido identificadas como causa de HC hereditário ou congênito, mas parecem ser raras. **Objetivos:** 1) Obter genealogia das famílias afetadas para determinação do padrão de herança, identificação de afetados e possíveis portadores; 2) Descrever as características clínica-demográficas dos pacientes com HC; 3) Determinar a distribuição mutacional no gene do receptor do hormônio estimulante da tireoide (TSHR) nos afetados; 4) Sugerir ações de saúde pública e de otimização do aconselhamento genético. **Material e Métodos:** Foram estudados 12 pacientes provenientes de Monte Santo-BA, sendo oito diagnosticados pela triagem neonatal e quatro diagnosticados tardiamente durante expedição à cidade. Estes últimos foram identificados durante a coleta dos dados genealógicos das famílias dos afetados. Todos foram investigados para mutações no gene do TSHR. Toda a região codificadora do gene foi amplificada através do DNA genômico, seguido de SSCP e sequenciamento. **Resultados:** À época da primeira avaliação, os pacientes apresentaram níveis elevados de TSH, confirmando o caráter primário da doença, associados a sinais e sintomas do HC. Observou-se grande heterogeneidade clínica entre os pacientes mesmo aqueles com grau de parentesco muito próximo. Nenhuma mutação patogênica foi encontrada no gene TSHR. **Conclusão:** a análise das genealogias permitiu observar a heterogeneidade clínica e genética da doença. Não foi encontrada nenhuma mutação no gene TSHR. O estudo de outros genes poderá ajudar no esclarecimento do HC na região.

Palavras-chave: hipotireoidismo congênito; receptor do TSH; mutação; SSCP

ABSTRACT

Introduction: Congenital hypothyroidism (CH) is one of the most common metabolic disease in childhood, with an incidence of HC is 1:3,000 to 1:5,000 live births. When primary, CH is characterized by high levels of TSH and may be caused by dysmorphogenesis deficient hormone production, or due to thyroid dysgenesis, embryological defect that leads to agenesis, ectopic or hypoplastic. In the absence of hormonal treatment leads to the CH severe mental retardation and other clinical manifestations. The interaction of stimulating thyroid growth, differentiation and function. Mutations in the TSHR gene have been identified as a cause of hereditary or congenital CH, but appear to be rare. **Objectives:** 1) Get genealogy of the affected families to determine the pattern of inheritance, and possible identification of affected patients; 2) Describe the clinical and demographic characteristics of patients with CH; 3) Determine the mutational distribution in the TSHR gene in the affected individuals; 4) Suggest public health actions and for genetic counseling optimization. **Methods:** We studied 12 patients from Monte Santo-Bahia, eight were diagnosed by newborn screening and four diagnosed late during an expedition to the city. The latter were identified during the collection of genealogical data of families those affected. All were investigated for mutations in the TSHR. The entire coding region of the gene was amplified using genomic DNA followed by SSCP and sequencing. **Results:** At first evaluation, all patients had elevated TSH levels, confirming the primary nature of the disease, associated with signs and/or symptoms of CH. As there was a familial recurrence of the disease, we noticed a large clinical heterogeneity among patients, even those with close family relationship. No pathogenic mutation was found in the TSHR gene. **Conclusion:** The analysis of pedigrees allowed to observe the clinical and genetic heterogeneity of the disease. We not found mutation in the TSHR. The study of other genes may help in clarifying the CH in the region.

Keywords: congenital hypothyroidism; TSH receptor; mutation; SSCP

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática da síntese dos hormônios tireoidianos	16
Figura 2: Estrutura dos hormônios da tireoide	17
Figura 3: Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide	18
Quadro 1: Etiologia do hipotireoidismo congênito e genes associados	20
Figura 4: Receptor do TSHR	22
Quadro 2: Mutações descritas no gene TSHR.....	23
Quadro 3: Primers utilizados para amplificação do gene TSHR.....	30
Figura 5: Heredograma casos 1, 2 e 9	37
Figura 6: Heredograma casos 3 e 4	37
Figura 7: Heredograma casos 5 e 6	38
Figura 8: Heredograma caso 8.....	38
Figura 9: Heredograma caso 7.....	38
Figura 10: Heredograma casos 10, 11 e 12	38
Figura 11: Eletroferograma éxon 7 gene TSHR sequência em heterozigose.....	39
Figura 12: Eletroferograma éxon 7 gene TSHR sequência em homozigose.....	39
Figura 13: Eletroferograma éxon 10 gene TSHR.....	39

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com HC de Monte Santo-BA	34
Tabela 2: Sinais e sintomas dos pacientes com HC de Monte Santo-BA	35
Tabela 3: Características clínicas e laboratoriais de quatro pacientes da região de Monte Santo -BA	36

LISTA DE ABREVIATURAS

TG – tireoglobulina
HT – hormônio tireoidiano
NIS – proteína co-transporte sódio/iodo
TSH – hormônio tireotrofina
PDS – pendrina
TPO – tireoperoxidase
MIT – monoiodotirosina
DIT – diiodotirosina
DEHAL-1 – enzima desalogenase 1
TR – receptores do hormônio tireoidiano
DNA – ácido desoxirribonucléico
TRH – hormônio liberador da tireotrofina
TITF-1/NKX2.1 – fator de transcrição tireoidiano 1
TITF-2/FOXE-1 – fator de transcrição tireoidiano 2
PAX-8 – *paired box transcription factor-8*
DT – disgenesia tireoidiana
TSHR – receptor da tireotrofina
POU1F1 – fator 1 de transcrição específico hipofisário
PROP1 – *profeta do PIT1*
LHX3 – *lim homeobox genes*
HESX1 – *homeobox embryonic stem cell*
SRTN – serviço de referência em triagem neonatal
APAE – associação de pais e amigos dos excepcionais

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Revisão da Literatura	15
2.1. Morfologia e Fisiologia da Glândula Tireoide – Aspectos Gerais	15
2.1.1. Transporte do iodeto	15
2.1.2. Organificação do iodo	16
2.1.3. Acoplamento	17
2.2. Hipotireoidismo Congênito: definição e causas	19
2.3. Disgenesia tireoidea (DT)	20
2.3.1. Receptor da tireotrofina (TSHR)	21
2.4. Defeitos genéticos na síntese hormonal - Disormonogênese	23
2.5. Deficiência no hipotálamo e hipófise	23
2.6. Hipotireoidismo Congênito: sinais e sintomas	24
2.7. Hipotireoidismo Congênito: diagnóstico e tratamento	25
3. Objetivos	27
4. Material e Métodos	28
4.1. Desenho de Estudo	28
4.2. Caracterização da Amostra	28
4.3. Avaliação Hormonal	28
4.4. Estudo Molecular	29
4.4.1. Extração de DNA	29
4.4.2. Reação em Cadeia da Polimerase	29
4.4.3. Eletroforese em gel de agarose	31
4.4.4. SSCP	31
4.4.5. Sequenciamento	32
5. Resultados	33
5.1. Avaliação clínica e hormonal	33
5.2. Genealogias	36
5.3. Estudo do gene do receptor do TSH	39
6. Discussão	40
7. Conclusão	43
8. Limitações do Estudo	44
9. Referências Bibliográficas	45
10. Apêndices	51
11. Anexo	57

1. INTRODUÇÃO

Incluído totalmente no “Polígono das Secas”, o Município de Monte Santo compreende uma área de 3.298 km². A população de Monte Santo é de aproximadamente 53.429 habitantes (IBGE, 2009), com 902 nativos registrados em 2008, cuja densidade demográfica é de 17,3 habitantes por km². Cerca de 80% da população reside na zona rural. Há 19.226 (34%) analfabetos maiores de 10 anos ou com escolaridade inferior a um ano (IBGE, 2003). O PIB/capita é de 2.477 (IBGE-2009).

De acordo com dados fornecidos pela APAE/Salvador (comunicação pessoal fornecida pelo Serviço de Referência em Triagem Neonatal – APAE/Salvador) e pelo Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário da UFBA, neste município têm sido diagnosticadas diversas doenças genéticas raras (PKU, HC e mucopolissacaridose tipo VI), em várias famílias residentes. Esta observação preliminar sugere estrutura reprodutiva endogâmica e de endocruzamento da população, principalmente na zona rural, que pode se relacionar com outras patologias crônicas, além das doenças genéticas, como doenças comuns (deficiência mental, hipertensão arterial, doença coronariana), susceptíveis de prevenção primária e terciária. Nos meses de Outubro de 2006, Julho de 2007, Maio de 2008, Outubro de 2009 e Novembro de 2010 foram realizadas expedições ao município de Monte Santo, com o apoio de várias instituições (FMB/UFBA, HUPES/UFBA, UFRB/UFBA, UFRJ, EBMSP, UNEB, APAE-SSA, IOC/FIOCRUZ, CPqGM/FIOCRUZ, REDE MPS BRASIL e Serviço de Genética Médica do HCPA/UFRGS). Nestas viagens foi possível constatar e diagnosticar novos casos de doenças genéticas raras, como: surdez hereditária não-sindrômica (SHNS), síndrome de Treacher-Collins (STC) e osteogênese imperfeita (OI), além das doenças já conhecidas: PKU, MPS-VI e HC. Com esses dados foi elaborado um projeto de pesquisa intitulado: “Genética no Sertão: Estudo de Doenças Genéticas Monogênicas Frequentes no Município de Monte Santo – Bahia”, aprovado pelo CEP/CPqGM nº parecer: 106/2006.

Nenhum estudo relativo à base molecular do hipotireoidismo congênito foi realizado nestes indivíduos. Frente a isso, tornou-se relevante fazer o estudo das mutações associadas aos casos ocorridos nesta região. O gene candidato para o estudo (TSHR) justifica-se pela característica estrutural da população e principalmente pela recorrência familiar observada. Os resultados contribuirão para melhoria da saúde pública na cidade de Monte Santo, assim como para o avanço das pesquisas relacionadas ao hipotireoidismo congênito no Brasil, permitindo otimização do aconselhamento genético na região. Além disso, a partir dos dados obtidos nessas expedições, observamos que é fundamental melhor caracterização da estrutura

populacional desse município e regiões vizinhas, correlacionando as bases moleculares das doenças genéticas identificadas e sua ancestralidade (comunicação pessoal de Angelina Xavier Acosta, coordenadora do referido projeto).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Morfologia e Fisiologia da Glândula Tireoide – Aspectos Gerais*

A glândula tireoide localiza-se no pescoço, logo abaixo da cartilagem cricoide, ao nível do segundo e terceiro anel traqueal (Inzucchi, 1999). A tireoide é responsável pela produção de hormônios essenciais para a regulação do consumo energético, desenvolvimento e crescimento. Isto requer integridade estrutural e funcional do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, regulação adequada do mecanismo de biossíntese, e aporte nutricional normal de iodo, principal constituinte destes hormônios e regulador da sua função (Vono-Toniolo & Kopp, 2004). Macroscopicamente, a tireoide é constituída de dois lobos conectados por um istmo. Microscopicamente, divide-se em lóbulos, compostos de 20 a 40 folículos, que são revestidos por células epiteliais as quais delimitam depósitos centrais de material amorfo denominado coloide. O folículo é a unidade funcional da tireoide. O coloide é composto principalmente de tireoglobulina (TG), a qual serve como matriz para a síntese dos hormônios tireoidianos (HT), e uma pequena parte de tiroalbumina iodada. Estas estruturas encontram-se em estreito contato com vasos sanguíneos, vasos linfáticos e terminações nervosas adrenérgicas (Inzucchi, 1999).

Dois são os hormônios secretados pela tireoide: 3,5,3',5'- tetraiodo-L- tironina (tiroxina ou T₄), forma predominante do hormônio produzido pela glândula e 3,5,3'- triiodotironina (T₃), forma ativa do hormônio (Barra, 2004). A síntese de HT envolve três etapas: a) transporte de iodeto, b) organificação do iodo e c) acoplamento aos resíduos tirosil de TG.

2.1.1 *Transporte do iodeto*

O iodo é o elemento essencial à biossíntese dos hormônios. O iodeto proveniente da dieta é absorvido no trato gastrointestinal, sendo captado da corrente sanguínea pela célula folicular tireoidiana por uma proteína transportadora do tipo co-transporte sódio/iodo (NIS), através de processo ativo que requer gasto de energia (Reed & Pangaro, 1995). Este transporte é regulado positivamente pelo hormônio estimulador da tireoide ou tireotrofina (TSH) (Reed & Pangaro, 1995; Inzucchi, 1999). Outro fator que regula o transporte de iodeto é o mecanismo de auto-regulação do tireocito, no qual a atividade do NIS varia inversamente com o conteúdo glandular de iodo (Vaisman *et al.*, 2004).

2.1.2 Organificação do iodo

Após a entrada na célula, a pendrina (PDS) é responsável pelo transporte do iodo até o lúmen folicular. Os íons de iodeto, antes de serem acoplados aos resíduos tirosil da TG, são oxidados pela enzima tireoperoxidase (TPO), que se torna ativa na presença do catalisador H_2O_2 - peróxido de hidrogênio (Figura 1).

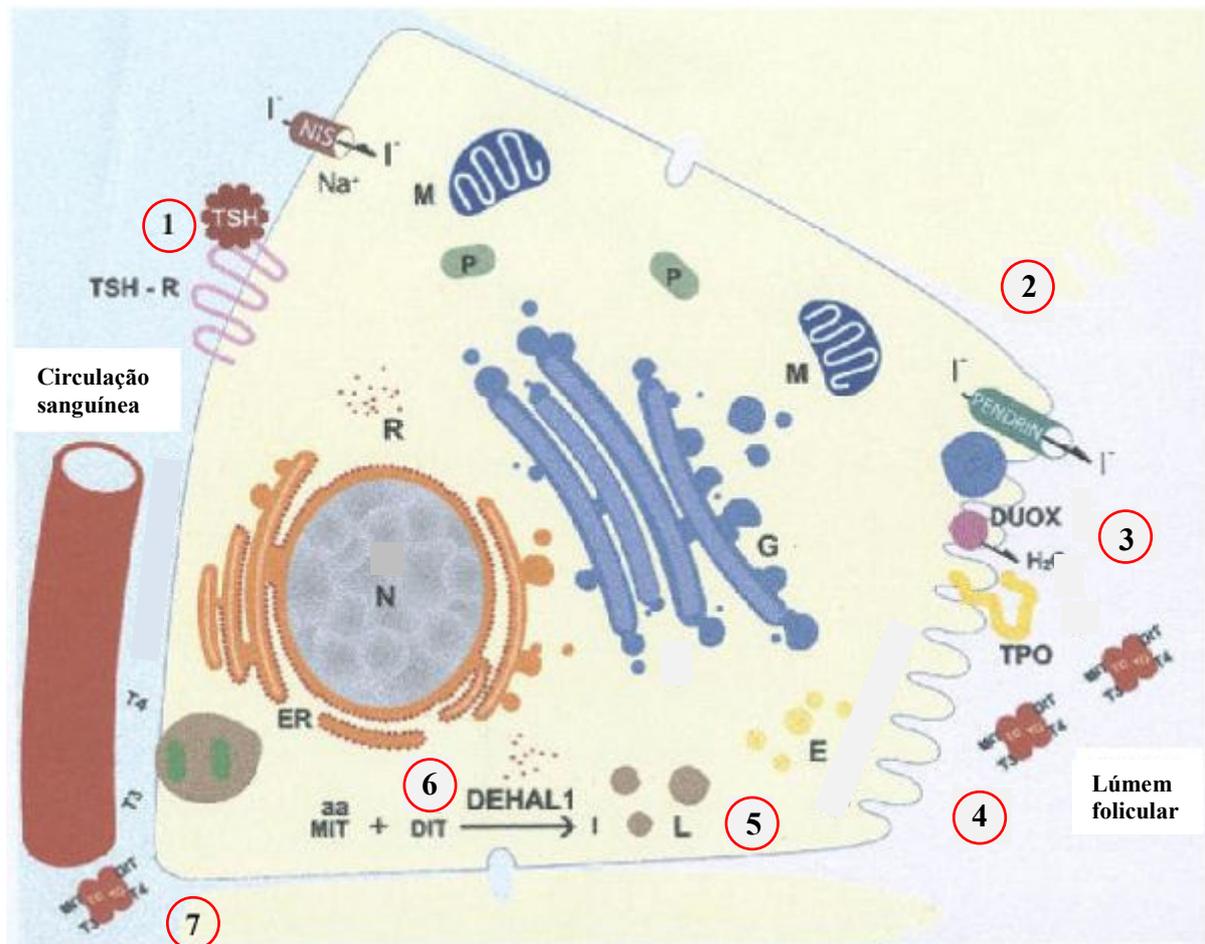


Figura 1: Representação esquemática da síntese dos hormônios tireoidianos. 1) Transporte do iodeto proveniente da dieta para o interior da célula pelo NIS; 2) Transporte do iodeto até o lúmen celular; 3) Oxidação dos íons iodeto pela TPO e H_2O_2 ; 4) Ligação do iodeto aos resíduos tirosil e formação dos hormônios tireoidianos; 5) Proteólise das moléculas TG-hormônio; 6) Desalogenação de MIT e DIT; 7) Liberação dos hormônios T_3 e T_4 e moléculas de TG.

L: lisossomo; M: mitocôndria; R: ribossomos; P: peroxissomo; G: complexo de Golgi; ER: retículo endoplasmático rugoso; N: núcleo; E: endossomo. Adaptado de Pardo, 2007.

2.1.3 Acoplamento

A ligação do iodeto aos resíduos tirosil da tireoglobulina envolve a substituição do anel tirosil, originando as iodotirosinas. Se um iodo substitui um hidrogênio, forma-se a monoiodotirosina (MIT); se dois iodios se ligam à tirosina, gera-se diiodotirosina (DIT) (Figura 1). Uma molécula de MIT e uma de DIT ligam-se para formar T₃ e duas de DIT ligam-se para formar T₄ (Figura 2) (Reed & Pangaro, 1995). O complexo TG-hormônio formado entra na célula por invaginação, e dentro dos lisossomos ocorre a proteólise para liberação dos hormônios T₃ e T₄ na corrente sanguínea, juntamente com algumas moléculas de TG maduras. As moléculas de MIT e DIT que não se ligaram para formar hormônio tireoidiano são desalogenadas pela ação da enzima desalogenase 1 (DEHAL-1) que libera o iodo para se reaproveitado pela célula (Rubio *et al.*, 2002).

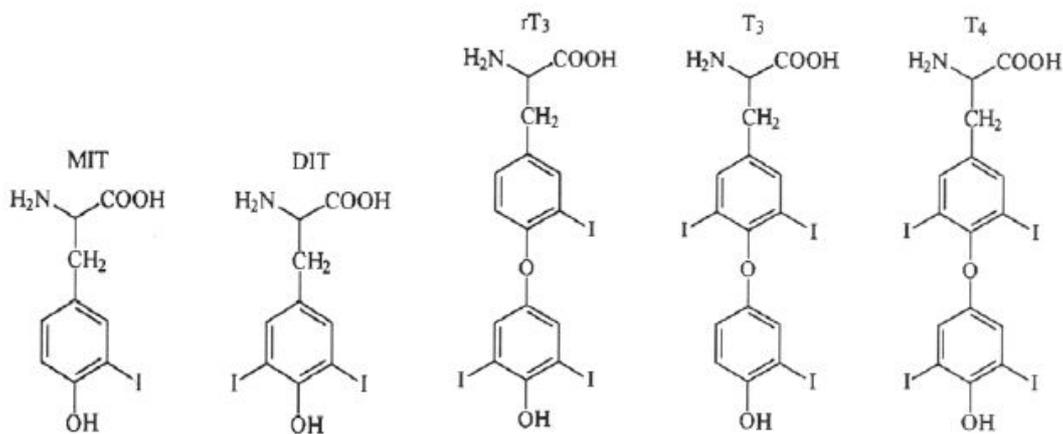


Figura 2: Estrutura dos hormônios da tireoide e dos seus precursores. MIT, 3-monoiodotirosina; DIT, 3,5-diiodotirosina; rT3, 3,3',5' triiodotironina inativa ou T3 reverso; T3, 3,5,3' triiodotironina; T4, 3,5,3',5' tetraiodotironina. Adaptado de Rodrigues, 2004.

Cerca de 0,03% do T₄ e 0,3% de T₃ total sérico está livre, o restante está ligado às proteínas plasmáticas carreadoras. A ligação destes hormônios às proteínas plasmáticas aumenta suas meias-vidas e assegura distribuição regular do hormônio nos tecidos alvos. São os hormônios livres que interagem com as células-alvo gerando resposta biológica. No interior da célula, o T₃ liga-se aos receptores do hormônio tireoidiano (TR), que são receptores específicos situados no núcleo, e possuem dois domínios de ligação: um para ligação com o ácido desoxirribonucléico (DNA), formado por dois dedos de zinco, e outro para ligação ao hormônio tireoidiano, que apresenta afinidade pelo T₃ muito maior do que pelo T₄ (Barra, 2004).

A secreção normal dos hormônios da tireoide depende do mecanismo retroativo negativo clássico do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. O hormônio liberador de tireotrofina (TRH), produzido pelo hipotálamo, estimula a hipófise anterior a secretar TSH, que, por sua vez, regula ampla variedade de processos fisiológicos e bioquímicos que estimulam as células foliculares da tireoide a liberar T_4 e T_3 . A produção de TRH e TSH é reprimida pelo aumento de T_3 e T_4 (Figura 3) (Lindsay & Toft, 1997).

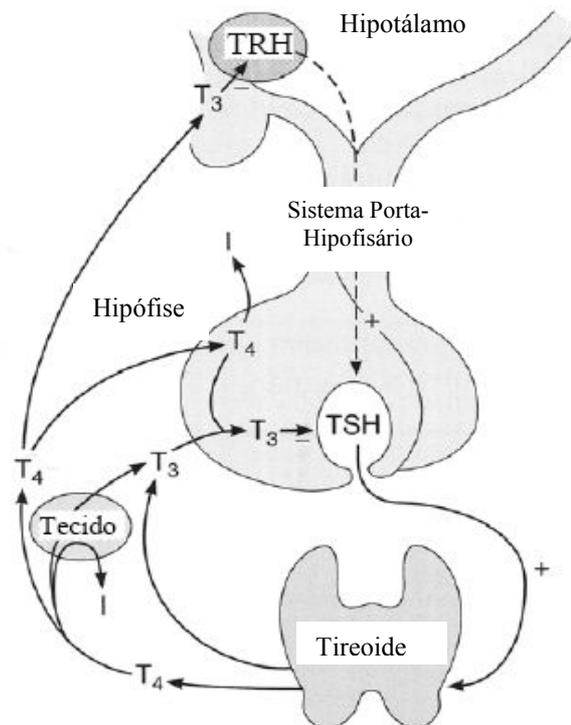


Figura 3: Regulação da síntese e secreção dos hormônios da tireoide. Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. Rodrigues, 2004.

Os efeitos do TSH incluem: aumento da transcrição do gene da TG, da TPO e do NIS, através da estimulação dos fatores de transcrição (fator de transcrição tireoidiano 1: NKX2.1/TITF-1; fator de transcrição tireoidiano 2: FOXE1/TITF-2 e *paired box transcription factor 8*: PAX-8), aumento da produção do H_2O_2 , alteração na distribuição da TPO, aumento nos níveis de T_3 quando comparado aos de T_4 , alteração da distribuição do T_4 nos resíduos de tirosina da TG, clivagem das ligações peptídicas associadas ao iodo, formação de gotículas de coloide e ativação das catepsinas dos lisossomos.

Todos esses aspectos da fisiologia da tireoide são importantes para compreensão da produção e regulação hormonal. Defeitos em um desses mecanismos tornam-se clinicamente evidentes pela alteração funcional glandular (Rodrigues, 2004).

2.2 Hipotireoidismo Congênito: definição e causas

O hipotireoidismo congênito (HC), desordem da função tireoidea decorrente da deficiente produção de hormônio da tireoide ou comprometimento da atividade receptora hormonal, é uma das doenças metabólicas mais comuns na infância (Rodrigues, 2004). A nível global e em regiões iodo suficientes, a incidência de HC é de 1:3.000 a 1:5.000 recém-nascidos (Lindsay & Toft, 1997; Rubio *et al.*, 2002; Vono-Toniolo & Kopp, 2004). Segundo Ribeiro *et al.*, 2002, dados obtidos pelo Centro de Triagem Neonatal de Porto Alegre em 2000, demonstraram incidência de 1:3.500. Em Minas Gerais, a incidência de 1:4.375 (Silva *et al.*, 2005), na Bahia, segundo Almeida, 2003, a incidência de HC foi de 1:4.000. Em trabalho realizado recentemente, a incidência na Bahia no ano de 2009 foi de 1:3.070 nascidos-vivos (Lacerda *et al.*, 2009). Estudos demonstram que a incidência de HC pode sofrer variação entre as diferentes etnias, áreas geográficas e na presença de consanguinidade. A frequência é maior em brancos do que em negros, sendo sua ocorrência três a quatro vezes maior no sexo feminino (LaFranchi, 1999).

O HC pode ser classificado em: a) primário, decorrente de alterações da glândula tireoide, principal causa de HC; b) secundário, devido a distúrbios hipofisários e c) terciário, causado por distúrbios hipotalâmicos.

Mundialmente a principal causa de HC é a deficiência de iodo na dieta. Nesta situação, ocorre diminuição do conteúdo de iodo intra-tireoideo e conseqüente comprometimento da produção dos hormônios da tireoide, causando graus variados de hipotireoidismo e elevada prevalência de bócio. Nos países iodo-suficientes a disgenesia tireoidea (DT), decorrente de defeitos embriológicos, é a causa predominante de HC, responsável por 85% dos casos de crianças afetadas. Os defeitos de síntese hormonal acontecem entre 10 e 15% dos casos de HC (Knobel *et al.*, 2001). Os genes associados às causas de HC estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1: Etiologia do hipotireoidismo congênito e genes associados.

HC Permanente Primário	Gene	Herança	Cromossomo
Disgenesia Tireoidea			
Agenesia	FOXE1/NKX2.1	AD/AR (?)	3q22/14q13
Hipoplasia	PAX8	AD	2q12-q14
Ectopia	Não identificado	-	
Receptor de TSH	TSHR	AR	14q31
Disormonogênese			
Transportador de Na/I	NIS	AR	19p12-13.2
Tireoperoxidase	TPO	AR	2p25
Geração de H ₂ O ₂	ThOx1/ThOx2 (?)	AD/AR (?)	15q15.3
Tireoglobulina	TG	AD/AR (?)	8q24
Síndrome de Pendred	PDS	AR	7q31
HC Secundário/Terciário			
DHHC (deficiência hormonal hipofisária combinada)	PROP1	AR	5p
	POU1F1	AD/AR	3p11
	LHX3	AR	9q34.3
	HESX1	AD/AR	3p221.2-p21.1
TRH	Não identificada	AR	3p
Receptor de TRH	TRH	AR	8p23
Subunidade TSH β	TSH β	AR	1p13

AD: autossômica dominante; AR: autossômica recessiva; FOXE1/NKX2.1: fator de transcrição da tireoide 2 e 1; PAX8: *paired domain*; TSHR: receptor do hormônio estimulante da tireoide; NIS: transportador sódio-iodo; TPO: tireoperoxidase; TG: tireoglobulina; PDS: síndrome de Pendred; PROP1: “profeta do PIT1”; POU1F1: fator 1 de transcrição específico hipofisário; LHX3: *lim homeobox genes*; HESX1: *homeobox embryonic stem cell*; TRH: hormônio liberador de tireotrofina; TSH β : beta subunidade do hormônio estimulador da tireoide. Adaptada de Rubio *et al.*, 2002 e Knobel, 2001.

2.3 Disgenesia tireoidea (DT)

A tireoide é a primeira glândula endócrina que surge no desenvolvimento embrionário. As células foliculares, responsáveis pela síntese hormonal, derivam quase exclusivamente do primórdio tireoideo. A DT pode decorrer de atireose ou *agenesia* glandular, definida como ausência de tecido tireoideo; *hipoplasia*, onde a glândula de tamanho reduzido encontra-se na posição cervical normal ou *ectopia*, com tecido tireoideo encontrado desde a base da língua até o mediastino (Knobel *et al.*, 2001; Tonacchera *et al.*, 2007). Os genes NKX2.1/TTF1, FOXE1/TTF2 e PAX-8, codificam fatores de transcrição indispensáveis ao desenvolvimento glandular e interagem com promotores da TG, TPO, TSH e seu receptor (TSHR) e/ou outros genes. Alterações em qualquer daqueles genes podem levar à DT (Knobel *et al.*, 2001), sendo que, mutações no NKX2.1/TTF1 e FOXE1/TTF2 estão relacionados com a forma sindrômica do HC (Vono-Toniolo & Kopp, 2004). Em cerca de 5% dos casos de HC foram evidenciadas mutações em genes envolvidos no desenvolvimento da glândula, mas a maioria dos casos é de ocorrência esporádica e sua patogênese permanece desconhecida, indicando a sua

complexidade (Castanet *et al.*, 2010; De Felice & Di Lauro, 2004). A elevada frequência de outros defeitos congênitos, sobretudo cardíacos, tem sido relatada, apoiando o papel de componente genético nessa doença. Outro indício de que HC pode ser doença hereditária é o fato de que alguns casos familiares de HC decorrem de DT (agenesia ou ectopia) (Knobel *et al.*, 2001; Tonacchera *et al.*, 2007; Castanet *et al.*, 2010).

2.3.1 Receptor da tireotrofina (TSHR)

O TSHR é uma proteína com 765 aminoácidos (De Felice & Di Lauro, 2004), pertence à superfamília de receptores associados à proteína G, que exibem estrutura comum consistindo de sete segmentos transmembranosos, três alças extracelulares, três alças intracelulares, extremidade extracelular aminoterminal e intracelular carboxiterminal (Figura 4). Em humanos o gene codificador do TSHR situa-se no cromossomo 14q31 (Knobel, 2001) expande-se por 191,1 Kb e contém 10 éxons (Guoa *et al.*, 2005; Kopp, 2001). O domínio extracelular amino-terminal é codificado pelos nove primeiros éxons e responsável pela ligação com o TSH, já a porção transmembranar e citoplasmática, responsável pela transdução do sinal à proteína G, é codificada pelo último e maior éxon (Park & Chatterjee, 2005) (Figura 5).

A interação do TSHR, presente na superfície das células foliculares da tireoide, com o TSH tem como função biológica induzir desenvolvimento da glândula. Além disso, também é importante para a função da mesma, regulando a expressão de proteínas envolvidas na biossíntese de HT, o que leva ao aumento da atividade glandular e conseqüente estímulo à secreção hormonal (Nunes, 2003; Yuan *et al.*, 2008). Em estudo realizado utilizando-se modelos animais, foi possível observar que a ausência do TSHR funcionante compromete a expressão de NIS e TPO na tireoide fetal, notando-se que a sinalização celular interna via TSHR é de fundamental importância no processo de diferenciação funcional. No entanto, a síntese de DNA e tamanho glandular durante a vida fetal não parece sofrer influência do TSHR, sugerindo diferentes mecanismos de controle do tamanho da tireoide fetal e adulto (Postiglione *et al.*, 2002).

Quadro 2: Mutações descritas no gene TSHR. Disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov. Adaptada de Perone, 2004(a).

Códon	Aminoácido Normal	Aminoácido Mutado	Referência
41	Cys	Ser	De Roux, 1996; Alberti, 2002
109	Arg	Gln	Clifton-Bligh, 1997
162	Pro	Ala	Sunthornthevarakul, 1995; De Roux, 1996; Tonacchera, 2001; Costagliola, 1999
167	Ile	Asp	Sunthornthevarakul, 1995; Costagliola, 1999
310	Arg	Cys	Russo, 2000
324	Gln	Stop	De Roux, 1996
390	Cys	Trp	De Roux, 1996; Biebermann, 1997
410	Asp	Asn	De Roux, 1996
450	Arg	His	Nagashima, 2001
467	Leu	Pro	Alberti, 2002
477	Thr	Ile	Tonacchera, 2000
498	Gly	Ser	Nagashima, 2001
525	Phe	Leu	De Roux, 1996
546	Trp	Stop	Clifton-Bligh, 1997; De Roux, 1996
553	Ala	Thr	Abramowicz, 1997
600	Cys	Arg	Alberti, 2002
609	Arg	Stop	Tiosano, 1999
655 - deleção	Thr	Stop	Gagné, 1998; Alberti, 2002
Sítio doador de <i>splice</i> intron 6		Transversão G→C	Gagné, 1998
<i>Splice</i> variante intron5/exon 6		AG	Bretones, 2001
406/420 in/del	Phe	Trp	Biebermann, 1997

2.4 Defeitos genéticos na síntese hormonal - Disormonogênese

Deficiência na função de qualquer uma das proteínas envolvidas na biossíntese dos hormônios da tireoide pode originar HC e bócio. Muitos genes estão envolvidos nesta condição tais como a TG, NIS, PDS e o tireoide oxidase 2 (THOX2) (Deladoe, 2008), porém, a deficiência na TPO é a causa mais prevalente de disormonogênese (Avbelj, 2007; Park & Chatterjee, 2007).

2.5 Deficiência no hipotálamo e hipófise

A mais prevalente causa de hipotireoidismo central é deficiência de TSH, causada por distúrbios hipotalâmicos ou hipofisários adquiridos ou congênitos. Os distúrbios congênitos são consequências de mutações nos genes POU1F1, PROP1, LHX3, HESX1, que codificam fatores de transcrição envolvidos na embriogênese hipofisária, que levam a alterações na

secreção de TSH, associada ou não à deficiência de outros hormônios hipofisários (Larsen & Davies, 2005).

2.6 Hipotireoidismo Congênito: sinais e sintomas

Os hormônios tireoidianos são de fundamental importância na vida fetal, uma vez que estimulam a síntese de fatores de crescimento como o fator de crescimento neuronal (NGF) e o fator de crescimento insulina símile (IGF), dos quais depende a ativação dos processos de proliferação, sinaptogênese e mielinização neuronal. A ativação da transcrição do gene do NGF regula todos estes processos, razão pela qual, no HC, observa-se acentuado grau de retardo mental. Se a deficiência hormonal não for corrigida no início da vida pós-natal, os danos são irreversíveis (Nunes, 2003; Larsen & Davies, 2005). Desta forma, o reconhecimento dos aspectos clínicos do HC é de grande importância e considerado urgência pediátrica entre os recém-nascidos (Pezzuti *et al.*, 2008). Entretanto, a maioria das crianças apresenta sinais e sintomas bastante inespecíficos e em apenas 5% delas é possível estabelecer o diagnóstico através do exame clínico nos primeiros dias de vida, demonstrando a importância dos testes laboratoriais de triagem neonatal. Os sinais mais precoces são icterícia prolongada ou recorrente, fontanela posterior aberta, macroglossia, atraso na queda do funículo umbilical e hérnia umbilical. Durante os primeiros meses de vida, os sintomas são dificuldades para alimentação, subdesenvolvimento, constipação, choro rouco, letargia, pele seca, fria, pálida e com *livedo reticularis*. Nos meses subsequentes, há atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, o crescimento é afetado devido ao atraso na maturação óssea, pode surgir mixedema por acúmulo de ácido hialurônico, que altera a composição da substância básica da derme e outros tecidos. O ácido hialurônico é material higroscópico responsável pela aparência grosseira e edemaciada, sendo caracteristicamente flácido e não-depressível (Larsen & Davies, 2005; Setian, 2007). As crianças hipotireoidianas têm ainda, maior risco de apresentarem outras anormalidades congênitas, que ocorrem em torno de 10% desta população em contraposição aos 3% observados na população geral. Anormalidades cardíacas são as mais frequentes e incluem defeitos nos septos atriais e ventriculares e estenose pulmonar (Sociedade Brasileira de Endocrinologia, 2005). Quando o hipotireoidismo não é tratado podem ocorrer alterações mais acentuadas, assim como outras alterações endócrinas. O retardo mental em alguns casos pode ser menos evidente, porém o crescimento é afetado e ocorre atraso na maturação óssea, além disso, pode acontecer atraso puberal ou puberdade precoce (Setian, 2007).

2.7 Hipotireoidismo Congênito: diagnóstico e tratamento

O HC quando não diagnosticado e tratado precocemente, leva a retardo mental grave e irreversível. Quanto mais cedo forem estabelecidos o diagnóstico e tratamento, menores são as chances da ocorrência de danos neurológicos. O diagnóstico clínico é difícil e incomum, razão pela qual, a triagem neonatal tem sido implementada (Lindsay & Toft, 1997; Benevides, 2006). Similarmente à fenilcetonúria (PKU), o HC tornou-se alvo dos programas de triagem por preencher todos os critérios preconizados para o rastreio neonatal de doenças metabólicas (Souza *et al.*, 2002). No Brasil, esse procedimento já é realizado há três décadas, entretanto, apenas em 2001 foi estabelecido o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) pelo Ministério da Saúde, organizando o serviço prestado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Benevides, 2006). O programa tem como objetivo promover a detecção de doenças congênitas em fase pré-sintomática em todos os nascidos vivos, permitindo gratuitamente o tratamento precoce e acompanhamento, diminuindo, conseqüentemente, a morbidade, suas conseqüências e a mortalidade gerada pelas doenças triadas. A garantia da efetivação do programa está vinculada à capacidade gestora de organização da rede de saúde, fundamental ao processo de qualificação da gestão (Ministério da Saúde, www.saude.gov.br/bvs). Tratando-se do HC, os níveis de corte do TSH utilizados como critério para reconvocar as crianças variam entre os programas. De modo geral, em crianças com mais de 48 horas de vida e TSH neonatal inferiores a 10 mUL/I no sangue total, nenhum seguimento é feito. Crianças com resultados de TSH entre 10 e 20 mUL/I realizam nova dosagem hormonal. Sendo este segundo resultado superior a 10 mUL/I, solicita-se o comparecimento da criança para consulta clínica e os testes de função tireoidiana são realizados em amostra de soro, quando deverão ser dosadas as concentrações de TSH e T₄ total ou T₄ livre. Na Bahia, neste ano de 2010, o valor de corte para o TSH foi diminuído para 9 mUL/I. É importante descartar o uso de drogas antitireoidianas pela mãe ou de soluções iodadas em berçário, ou detectar o hipotireoidismo materno, que pode levar à passagem placentária de auto-anticorpos bloqueadores da tireoide fetal e levar ao hipotireoidismo transitório. A ultrassonografia é exame complementar importante no diagnóstico para avaliar a localização da glândula, determinando ectopia, ou glândula *in situ* e bócio. No entanto, a depender da experiência do operador, em alguns casos o referido exame pode não ser sensível para o diagnóstico. Independente da etiologia do HC, o tratamento constitui-se de reposição hormonal com tiroxina sintética (levotiroxina ou L-tiroxina) para manutenção dos níveis séricos de tiroxina em valores normais, permitindo o desenvolvimento psicomotor normal do paciente

(Sociedade Brasileira de Endocrinologia, 2005; Setian, 2007; Ministério da Saúde, www.saude.gov.br/bvs).

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar o gene do TSHR em pacientes com hipotireoidismo congênito não-sindrômico (HCNS) da região de Monte Santo – Bahia e seus familiares.

Objetivos Específicos

- Obter genealogia das famílias afetadas para determinação do padrão de herança, identificação de afetados e possíveis portadores
- Descrever as características clínica-demográficas dos pacientes com HC
- Determinar a distribuição mutacional no gene do receptor do hormônio estimulante da tireoide (TSHR) nos afetados
- Sugerir ações de saúde pública e de otimização do aconselhamento genético

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Desenho de estudo*

Este é um estudo descritivo de corte transversal, a partir de indivíduos com hipotireoidismo congênito não-sindrômico com etiologia não esclarecida do município de Monte Santo - BA. Realizou-se coleta de dados clínicos e laboratoriais a partir dos prontuários dos pacientes utilizando-se formulário padrão (Apêndice 1). Todos os participantes (ou responsável) assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 2), estando o projeto aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – CPqGM da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (parecer N° 182/2008, protocolo 274) (Anexo 1) e pelo Núcleo de Pesquisa Científica NUPEC - APAE/Salvador-BA (parecer N° 18/2008) (Anexo 2).

4.2 *Caracterização da amostra*

Todos os pacientes com alterações hormonais foram selecionados, sendo a amostra composta por 12 pacientes. Destes, oito pacientes foram diagnosticados precocemente pelo Serviço de Referência em Triagem Neonatal - APAE/Salvador e quatro tiveram o diagnóstico tardio, durante expedição à região. Estes últimos foram referenciados pelos familiares, durante coleta da genealogia, descritos como “tolos”, tendo “caroço no pescoço” ou “pequenos”. A genitora de dois pacientes com história de “tireoidectomia ainda jovem por bócio” foi incluída no estudo das mutações, porém não foi possível confirmar se apresentava hipotireoidismo congênito. Não houve casos de pacientes com síndromes associadas. Todos os pais e mães participaram do estudo com exceção dos pais do caso 3, já falecido, e caso 8, que reside em São Paulo, resultando num total de 28 indivíduos.

4.3 *Avaliação Hormonal*

Os valores das dosagens do TSH foram obtidos retrospectivamente através de dados do prontuário. As dosagens dos hormônios T₄ e TSH foram realizadas a partir de sangue coletado em papel filtro pelo método de imunofluorimetria seguindo o protocolo da triagem neonatal do SRTN– APAE/Salvador -BA. Os valores de referência para o T₄ foram de 6,0 a 17,0 µg/dL e para o TSH < 10,0 µg/dL em neonatos. Para os pacientes diagnosticados tardiamente a dosagem hormonal foi realizada através do soro plasmático pelo método de

eletroquimioluminescência com valores de referência para adultos: T4 livre: 0,81 a 1,7 ng/dL; T4 total: 4,6 a 12 µg/dL e TSH: 0,27 a 5,2 µUI/ml.

4.4 *Estudo molecular*

4.4.1 Extração de DNA

Para a realização do estudo molecular foi coletado de cada indivíduo 5 ml de sangue venoso, em tubo Vacutainer® contendo anticoagulante EDTA. A extração do DNA de células mononucleares foi feita pelo método de extração salina, como descrito por Lahiri *et al.*, 1991, ou fenol-clorofórmio (Panasci *et al.*, 1977). Posteriormente, o DNA foi armazenado a - 20°C e estocado no Laboratório Avançado de Saúde Pública - LASP/CPqGM/FIOCRUZ - BA.

4.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram analisados todos os 10 éxons do gene do TSHR. Para amplificação por PCR foram utilizados *primers* descritos por De Roux (1996-a), sendo que, para a amplificação do éxon 10, por ser um éxon grande, foram utilizados dois pares de *primers*, como apresentados no Quadro 3.

Para todas as reações de PCR foram utilizados: tampão de reação 10X (10mM tris-HCl pH 8,5, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂ 0,01%), 200mM de cada dNTP, 0,25mM de cada *primer*, 1U de *Taq*DNA polimerase e 100ng de DNA. As amostras foram denaturadas a 94°C por 5 minutos, seguidas de trinta ciclos de amplificação de: 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Após o último ciclo seguiu-se uma extensão final de 5 minutos a 72°C e resfriamento a 4°C.

Quadro 3: *Primers* utilizados para amplificação do gene TSHR, temperatura de anelamento e tamanho do fragmento.

Éxon	T.A.	T. Fragmento	<i>Primer Forward 5' – 3'</i>	<i>Primer Reverse 5' – 3'</i>
1	54°C	302	GAGGATGGAGAAATAGCCCCGAG	CACTACTTCGGGCTGTTATTGAG
2	52°C	297	CAGCCAACATATTGTGAAAAGT	CTGCCATTGATTTATGCAAGT
3	57°C	242	GGGAAGCGCATAACAAAAAG	TGGAGCCCCAAGATTATGAG
4	54°C	329	ACCCTGTGGCGTAAATGCATAT	CCCGACCCAGGCTATACACCATT
5	56°C	250	GGAAGGTGTTGGGAGTTTGA	CAAACAAAATATTGTCAAACATGG
6	54°C	293	TATTGTGTCCTGTTATTTAAGTGCATA	GTACTCTATAGAGTATATATGATAAGG
7	56°C	204	GGGATACATATGTGGGAGCTG	CCCTTGACTTACACAGCATCC
8	54°C	198	TGGTCACATTTTATTCTGATATTTGT	ATATTCTTTTGTATGTCTTACTC
9	57°C	394	CCATCCCTCTTAGACCAGA	TCCACCAAGGTCTTTTGTCA
10A	66°C	868	TGGCACTGACTCTTTTCTGT	GTCCATGGGCAGGCAGATAC
10B	64°C	876	ACTGTCTTTGCAAGCGAGTT	GTGTCATGGGATTGGAATGC

T.A.: temperatura de anelamento; T. Fragmento: tamanho do fragmento.

4.4.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados pela PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,0% ou 2,0% e verificado o tamanho do fragmento amplificado comparando-o com marcador de peso molecular (Invitrogen[®], Life Technologies[™], Brazil). Para corrida do gel utilizou-se tampão TAE (Tris-ácido acético – EDTA). A visualização foi realizada através da coloração com brometo de etídio utilizando-se transiluminador com luz ultravioleta (UV). Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à análise por polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) e/ou sequenciamento.

4.4.4 SSCP

Este método de triagem de mutações permite detectar alterações na mobilidade eletroforética de fitas simples de DNA em condições não denaturantes quando na presença de alguma variação na sequência de interesse do estudo. As fitas simples de ácidos nucleicos formam estruturas secundárias em solução que dependem da composição/sequência de bases e do tamanho da fita simples. Mudança em uma base na sequência do ácido nucleico amplificado pela PCR pode ser detectada por SSCP (Orita *et al.*, 1989). Para o preparo do gel foram diluídos em água destilada: TBE (TRIS base, ácido bórico e EDTA 0,5M/pH0,8), poliacrilamida (acrilamida, bis-acrilamida e água destilada-q.s.p.) na concentração de acordo com o tamanho do fragmento, APS (persulfato de amônia) e TEMED. A técnica consistiu em adicionar ao produto da PCR (10µl) 5µl de formamida e 5µl de corante (xileno/glicerol) e desnaturar por 6 minutos a 94°C, sendo em seguida colocadas no gelo por 5 minutos e aplicadas no gel de poliacrilamida e, após corrida, corados com nitrato de prata. Para a eletroforese foi utilizado o tampão TBE entre 100 e 150V e o tempo de corrida variou de 12-17 horas de acordo com o tamanho dos fragmentos analisados.

Coloração com Nitrato de Prata e Secagem do Gel

A coloração foi feita de acordo com o protocolo adaptado de Sanguinetti *et al.*, 1994, e seguiu três etapas diferentes: impregnação com nitrato de prata, revelação e fixação das bandas visualizadas. As soluções utilizadas equivalentes à coloração de 1 gel foram:

- Solução de nitrato de prata: 0,3g de nitrato de prata dissolvidos em 2mL (q.s.p.) de água destilada.
- Solução fixadora: 25mL de etanol (PA) e 2mL de ácido acético glacial (PA) dissolvidos em 273mL de água destilada (volume final 300mL).
- Solução reveladora: 4,5g de hidróxido de sódio (NaOH) dissolvidos em 200mL (q.s.p.) de água. Durante a coloração foi adicionado 1mL de formaldeído.

Impregnação com nitrato de prata: após remover o gel das placas de vidro o mesmo foi colocado em recipiente contendo 150mL de solução fixadora, adicionou-se então, 2mL de nitrato de prata e agitou-se 5 minutos. A solução foi então descartada e o gel lavado com água destilada durante cerca de 10 segundos, agitando levemente, descartando a água.

A solução reveladora foi adicionada cuidadosamente ao recipiente contendo o gel e logo após foi adicionado o formaldeído. O recipiente foi submetido à agitação por alguns minutos até que as bandas aparecessem nitidamente.

Após revelação das bandas a solução reveladora foi descartada, e a reação fixada com a adição de 150mL de solução fixadora ao recipiente contendo o gel, o qual foi agitado por 5 minutos.

Todos os géis passaram por simples processo de secagem para que pudessem ser armazenados para análises e confirmações posteriores. Duas folhas celofanes foram molhadas com a solução fixadora; uma placa de vidro com a área maior que a do gel foi coberta com uma das folhas; o gel, molhado com a solução fixadora, foi colocado sobre a placa com o celofane e coberto com a outra folha de celofane sem deixar bolhas, mantido então em temperatura ambiente por dois ou três dias até a secagem completa, quando foi devidamente identificado e arquivado.

4.4.5 Sequenciamento

As amostras que demonstraram um padrão de banda variante no gel de SSCP foram sequenciadas a partir dos produtos de PCR purificados utilizando o kit de purificação da INVITROGEN[®] (*PureLinkTM PCR Purification Kit e/ou GE Healthcare[®] IllustraTM; GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit*) e sequenciados no sequenciador automático ABI3100 utilizando o kit *BigDyeTM Terminator Sequencing Standard (Applied Biosystems)*. Os resultados foram analisados por comparação da sequência obtida com a disponível em banco de dados para o gene TSHR (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed).

5. RESULTADOS

5.1 *Avaliação Clínica e Laboratorial*

Doze pacientes com HC do município de Monte Santo-BA foram estudados. Os níveis de TSH estavam elevados em todos os pacientes, confirmando o caráter primário do HC, como demonstrado nas Tabelas 1 e 3.

Pacientes diagnosticados pela triagem neonatal

Oito pacientes foram diagnosticados na triagem neonatal entre os anos de 2001 e 2008, sendo a média de idade dos mesmos na primeira avaliação de $50 \pm 31,8$ (12 a 87) dias de vida. Os sinais e sintomas à época do diagnóstico estão descritos na Tabela 2. Observa-se que todos os pacientes apresentavam alguma manifestação clínica por ocasião da avaliação médica inicial.

A média de estatura no momento da última avaliação foi de $0,8 \pm 1,3$ (-2,4 a 1,2) DP, entretanto, três pacientes apresentavam baixa estatura. Não foi encontrada correlação entre a idade ao diagnóstico e a estatura atual.

Tabela 1: Características clínicas e exames laboratoriais dos oito pacientes com HC da região de Monte Santo-BA diagnosticados pelo SRTN-APAE/Salvador-BA.

	Caso 1	Caso 2 ^a	Caso 3 ^b	Caso 4 ^c	Caso 5 ^d	Caso 6 ^e	Caso 7	Caso 8 ^f
Idade diag. (dias)	20	77	12	32	84	87	39	6
Idade atual (anos)	9,3	5,5	7,2	8,6	5,4	5,4	3,8	5,6
Idade Trat. (anos)	134	78	60	62	132	132	40	47
Gênero	M	F	M	F	F	F	F	F
Estatura atual (DP)	-2,94	0,93	0,8	1,31	-2	0,54	-2,61	2
Exame da tireoide	aumentada	aumentada	palp. (N)	aumentada	impalpável	impalpável	impalpável	palp. (N)
Exames ao diagnóstico								
TSH(μg/dl)	100	100	142	139	44,8	37,8	1057	185
T4T(μg/dl)	SI	7,3	14,7	2,64	11,9	12,8	SI	SI
T4L(μg/dl)	SI	0,68	1,21	SI	1,17	1,23	SI	SI

Valor de referência: TSH: 0-12m: 1,36 a 8,8; 1-6 anos: 0,85 a 6,5; 7-12 anos: 0,28 a 4,3uIU/mL. T4T: 4,6 a 12,0 uIU/mL; T4L: 0-12m: 1,1 a 2,0; 1-6 anos: 0,9 a 1,7; 7-12 anos: 1,1 a 1,7uIU/mL (Centro de Diagnóstico e Pesquisa – Serviço de Referência em Triagem Neonatal – APAE/Salvador-Bahia).

a) prima do caso 1; b) portador de cardiopatia congênita (estenose de válvula pulmonar de grau severo); c) irmã do caso 3; d) história de crises convulsivas, DNPM levemente atrasado; e) irmã do caso 5; f) DNPM atrasado

Palp. (N): palpável normal.

Idade Trat.: idade do início do tratamento.

SI: sem informação.

DNPM: desenvolvimento neuro-psico-motor.

Tabela 2: Sinais e sintomas de oito pacientes com HC da região de Monte Santo-BA.

Sinais e sintomas	n= 8	%
Choro rouco	5	62,5
Pele seca	3	37,5
Obstipação	3	37,5
Mixedema	4	50
Sucção débil	4	50
Hérnia umbilical	4	50
Hipotonia	2	25
Letargia	2	25
Macroglossia	2	25
<i>Livedo reticulares</i>	2	25
Encurtamento de tendão	2	25
Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor	2	25
Fontanela posterior aberta	1	12,5
Sopro cardíaco	1	12,5
Extremidades frias	1	12,5

Pacientes com diagnóstico tardio

Quatro pacientes tiveram o diagnóstico tardio (Tabela 2), já na idade adulta, identificados durante coleta dos dados genealógicos das famílias dos afetados. Contudo, em dois deles, casos 9 e 12, foi detectado apenas o TSH elevado não sendo possível confirmar o hipotireoidismo congênito. Particularmente, os casos 10 e 11, foram identificados durante coleta das genealogias dos familiares de um paciente com mucopolissacaridose VI.

Tabela 3: Características clínicas e exames laboratoriais dos quatro pacientes da região de Monte Santo-BA diagnosticados tardiamente.

	Caso 9 ^a	Caso 10	Caso 11 ^b	Caso 12 ^c
Idade diag. (anos)	27	25	19	29
Idade atual (anos)	29	26	20	30
Gênero	M	F	M	M
Exame da tireoide	SI	SI	SI	bócio
Quadro clínico			Retardo mental,	SI
	Retardo mental, baixa estatura (?)	Retardo mental, baixa estatura	baixa estatura, hérnia umbilical	
Exames ao diagnóstico				
TSH(μg/dl)	7,0	64,1	100	29,4
T4T(μg/dl)	SI	SI	SI	3,2
T4L(μg/dl)	SI	SI	SI	0,5

Valor de referência: TSH: 0,27 a 5,2 uIU/mL (SRTN – APAE/Salvador-Bahia).

Idade diag.: idade ao diagnóstico; a) primo dos casos 1 e 2; b) irmão do caso 10, possuem ainda, uma irmã adulta com retardo mental, porém não participou do estudo; c) primo dos casos 10 e 11, DNPM não foi avaliado.

SI: sem informação.

5.2 Genealogias

Ao analisar as características das famílias incluídas no estudo observou-se que a filiação biológica foi referida por todos os participantes. Foram obtidas informações de doze pacientes, sete do sexo feminino, a partir das quais sete famílias e nove núcleos familiares (pai, mãe e filho) foram identificados em um total de 1.279 indivíduos (Figuras 5, 6, 7, 8, 9 e 10). Não houve relato de outros possíveis afetados com características da doença em duas famílias. Nas demais, a recorrência de outros indivíduos descritos com características da doença foi relatada. Ao realizar a busca destes indivíduos em uma família não os encontramos em suas residências, em outro, a paciente apresentava retardo mental grave e nos outros casos os indivíduos já haviam falecido. A maioria relatou consanguinidade, em apenas três famílias não houve parentesco entre os pais.

Os indivíduos participantes do estudo estão indicados por setas. Aqueles pintados com a cor cinza são possíveis afetados. Os que apresentam cor cinza, e apontados com seta, participam do estudo, no entanto não tiveram o diagnóstico de hipotireoidismo congênito confirmado.

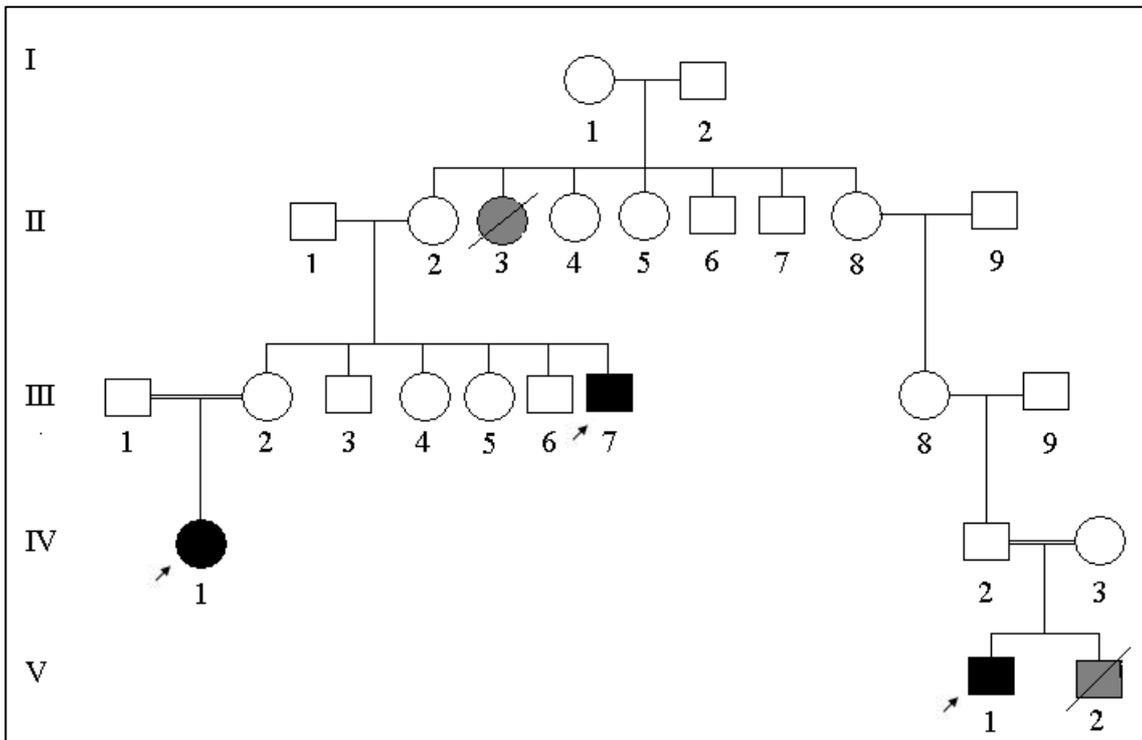


Figura 5: Heredograma casos 1 (V-1), 2 (IV-1) e 9 (III-7).

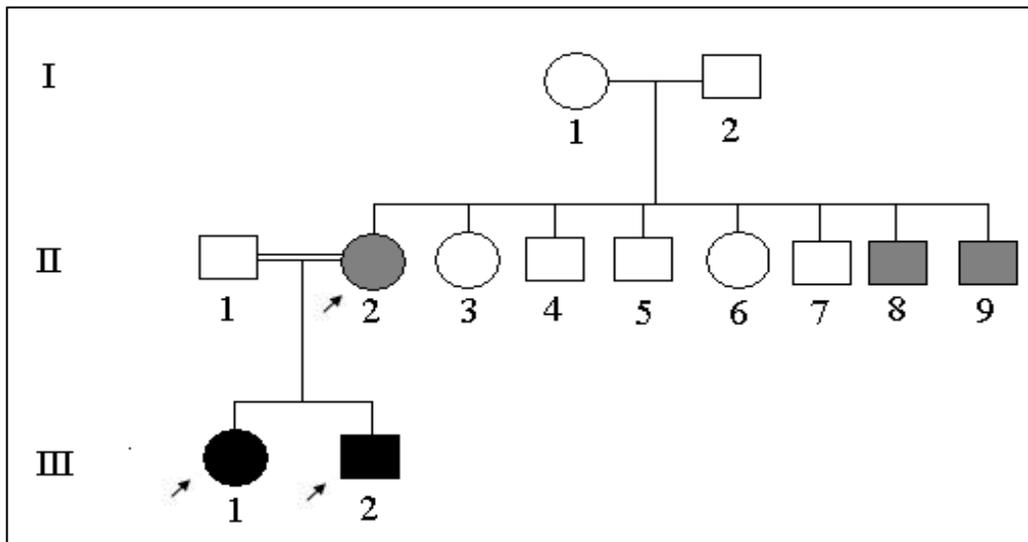


Figura 6: Heredograma casos 3 (III-1) e 4 (III-2).

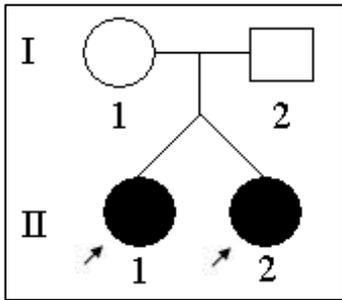


Figura 7: Heredograma casos 5 (II-1) e 6 (II-2).

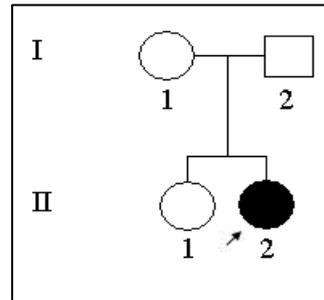


Figura 8: Heredograma caso 8 (II-2).

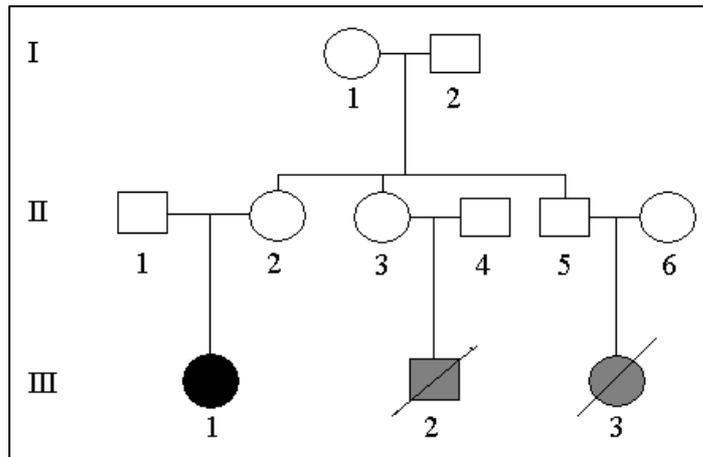


Figura 9: Heredograma caso 7 (III-1).

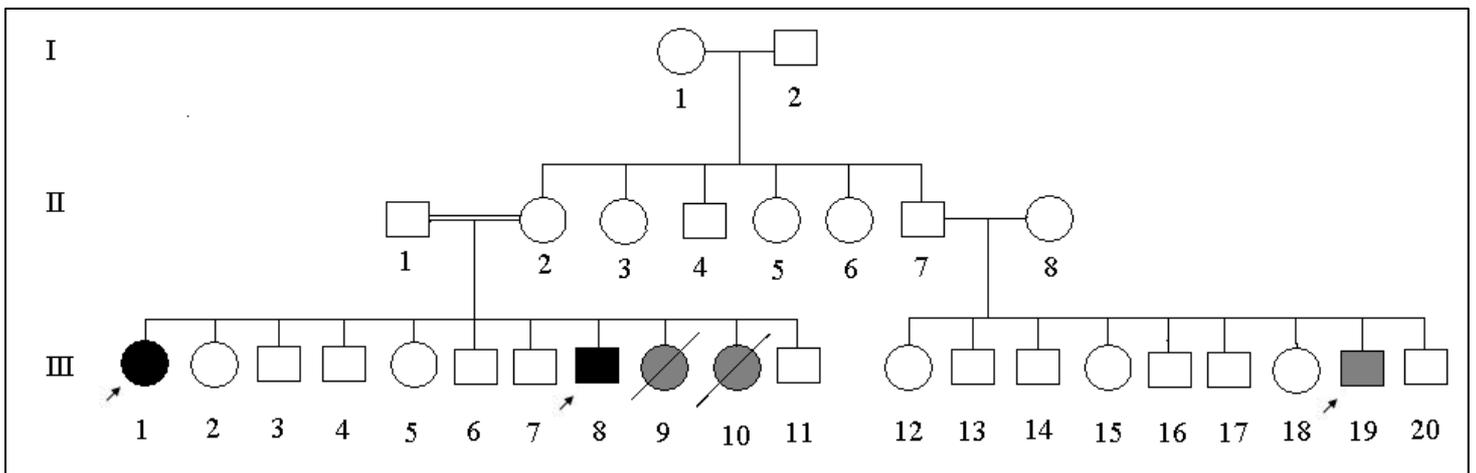


Figura 10: Heredograma casos 10 (II-1), 11 (II-8) e 12 (II-19).

5.3 Estudo do gene do receptor do TSH

Nenhuma mutação patogênica foi encontrada. Foi identificado em três pais (casos 5 e 6, 7 e 9), uma paciente (caso 8) e sua mãe, o polimorfismo (AAT/AAC) – em heterozigose – já descrito por De Roux (1996-a), no éxon 7, no códon 187 que codifica para o aminoácido Asparagina (Figura 11). Todos os outros pais e pacientes foram homozigotos para T/T (Figura 12).

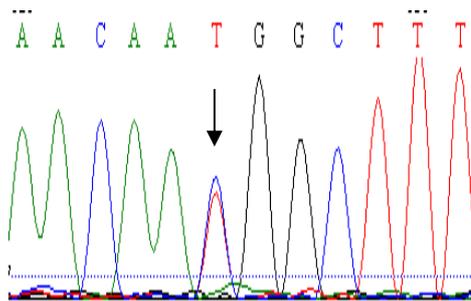


Figura 11: Eletroferograma de parte do éxon 7 do gene TSHR. A seta indica a sequência em heterozigose C/T.

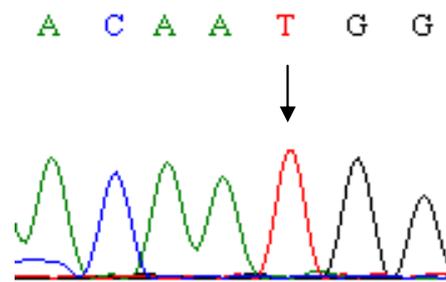


Figura 12: Eletroferograma de parte do éxon 7 do gene TSHR. A seta indica a sequência em homozigose para T/T.

O estudo foi iniciado pelo éxon 10 deste gene, uma vez que a maioria das mutações descritas na literatura situa-se nesta região. O polimorfismo previamente descrito onde a troca G/C na posição 2182, altera o terceiro nucleotídeo do códon 727 (Glu727Asp), foi encontrado em homozigose em todos os pacientes e pais (Figura 13).

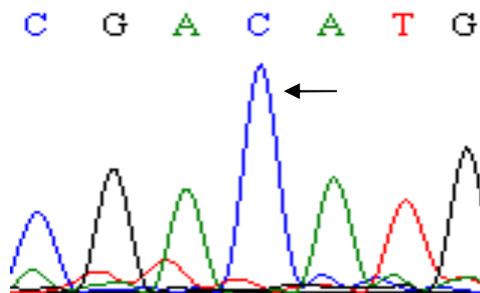


Figura 13: Eletroferograma de parte do éxon 10 do gene TSHR. A seta indica a localização da troca em homozigose C/C.

6. DISCUSSÃO

Hipotireoidismo congênito é uma doença relativamente frequente. Em regiões iodossuficientes afeta aproximadamente 1 em 4.000 recém-nascidos, sendo uma das principais causas de retardo mental. Habitualmente, não é possível estabelecer o diagnóstico do HC através do exame clínico do paciente nos primeiros dias de vida, devido à apresentação inicialmente assintomática da doença na maioria das crianças. Entretanto, algumas crianças já nascem com os sinais e sintomas característicos da doença. A maioria dos casos de HC, 85%, decorre de DT, secundária a defeitos embriológicos. A causa da DT está parcialmente esclarecida, sendo que, na maioria dos casos ela é esporádica, mas em aproximadamente 2%, é familiar. O HC por disormonogênese responde por 15% dos casos e em sua maioria é de origem genética autossômica recessiva (Rubio *et al.*, 2008; Castanet *et al.*, 2010; Lindsay & Toft, 1997; De Felice & Di Lauro, 2004).

No presente estudo, todos os oito pacientes diagnosticados através da triagem neonatal apresentavam sinais ou sintomas compatíveis com o diagnóstico no momento da primeira avaliação clínica. Isto pode dever-se ao diagnóstico tardio, já que apenas dois pacientes foram diagnosticados antes de um mês de vida, ou pode corroborar os achados de Pezzuti *et al.*, (2009), que, em trabalho realizado em Minas Gerais, ressaltam a importância da presença dos sinais e sintomas para identificação dos casos de HC. Esses autores sugerem que hipotonia, macroglossia e sucção débil estão relacionadas com quadros mais graves de HC e são sinais e sintomas com maior especificidade para o diagnóstico clínico da doença. Benevides *et al.*, (2006), em trabalho realizado no Pará, também chamam atenção para a presença de sinais e sintomas clínicos da doença no momento da primeira avaliação. Naquele estudo a presença de hérnia umbilical apresentou maior frequência sobre os demais sinais e sintomas. Os pacientes do presente estudo foram avaliados num Centro de Referência, e o diagnóstico laboratorial já estava estabelecido antes da consulta médica, o que pode ter gerado viés de observação, contribuindo para a elevada frequência de achados clínicos à época do exame médico. Os quatro pacientes diagnosticados na idade adulta apresentavam quadro clássico de HC não tratado, incluindo baixa estatura e retardo mental grave. Chama atenção a heterogeneidade clínica observada nos pacientes que tiveram o diagnóstico estabelecido durante expedições à Monte Santo, como nos casos 9, 10 e 11. Os casos 9 e 10, irmãos, que tiveram o diagnóstico aos 26 e 20 anos, respectivamente, não apresentavam bócio, já o caso 11 primo de primeiro grau dos casos 9 e 10, diagnosticado aos 30 anos, apresentava bócio, relatado pelos pais desde a primeira infância.

Embora a média da estatura dos pacientes tenha sido normal, três dos pacientes com HC diagnosticados na triagem neonatal tinham baixa estatura à época da última avaliação, com idades entre 2,7 e 8,1 anos. Essa alteração pode ser secundária ao uso inadequado do hormônio tireoidiano, ou pode estar associado à baixa estatura familiar, que não foi avaliada no estudo.

O tratamento do HC é considerado adequado quando iniciado a partir do 14º dia de vida e tardio quando iniciado depois de 30 dias de vida, já que, durante esse período danos cerebrais já podem ter ocorrido (LaFranchi, 1999). Bagattoli *et al.* (2000) discutem a importância da adesão ao tratamento assim como as dificuldades no estabelecimento do mesmo, principalmente por parte da população de baixo poder econômico, já que a constância no tratamento, observação da dosagem e regularidade no horário de uso da medicação são fundamentais para garantir o sucesso terapêutico do HC. Como o tratamento para o HC independe da sua etiologia, normalmente exames adicionais como a ultrassonografia, cintilografia e teste do perclorato não são realizados no SRTN-APAE-Salvador/BA. Apesar destes exames serem fundamentais para caracterização dos pacientes e desta forma guiar o estudo molecular, eles aumentam o custo do serviço e necessitam de um operador com experiência para o correto diagnóstico diferencial. Isto foi um fator limitante do estudo, uma vez que a falta de dados clínicos mais minuciosos dos pacientes, e a não realização dos exames complementares ao diagnóstico, dificultou o esclarecimento da etiologia do HC assim como o gene possivelmente relacionado aos casos. Desta forma, análise das genealogias obtidas foi utilizada como norteador do estudo molecular. A escolha do gene do TSHR partiu da observação da recorrência familiar da doença podendo ser explicada pela existência de relacionamentos endogâmicos e endocruzamento, associada ainda, ao padrão de herança sugestivamente autossômico recessivo na sua maior parte, com exceção da família dos casos 3 e 4, na qual o HC parece ter herança autossômica dominante.

Embora o diagnóstico molecular não interfira no tratamento dos pacientes com HC, este, é de grande importância para a compreensão dos mecanismos moleculares da doença. Mutações no gene do TSHR que resultam na perda de sua função têm sido descritas como causa de HC hereditária ou congênita (Duprez, 1998), e em pacientes com histórico de consanguinidade e má formações, principalmente cardíacas, contudo, o encontro de mutações neste gene parece ser raro (0,01%) (Tonacchera *et al.*, 2007). Por não existir um “hotspot” neste gene para mutações com perda de função, foram estudados todos dez éxons constituintes.

O polimorfismo identificado em quatro indivíduos no éxon 7, 14,3% em heterozigose (C/T) e 85,7% em homozigose para T/T, já havia sido descrito por De Roux *et al.*, em 1996-a, que sequenciaram todo gene do TSHR em 15 pacientes e, em 60% desses detectaram que a asparagina 187 era codificada pelo códon AAT e, em 40% dos pacientes pelo códon AAC. Perone *et al.*, (2004-b) também identificaram este polimorfismo em estudo com 45 pacientes onde 43,3% foram heterozigotos, 36,7% homozigotos para T/T e, em 20% homozigotos para C/C.

Outro polimorfismo também detectado neste estudo foi a troca G>C na posição 2182 (Glu727Asp), sendo todos os pais e pacientes foram homozigotos para C/C. Beltrão *et al.*, (2009), em estudo com 11 pacientes, encontraram o mesmo polimorfismo em heterozigose em dois pacientes e em homozigose nos demais. Ramos *et al.*, (2009) em estudo envolvendo 35 indivíduos também identificaram esta troca em uma paciente. Musa *et al.*, (2008), investigou a possível relação entre este polimorfismo e pacientes com HC utilizando 104 indivíduos normais e 33 afetados através da técnica de PCR-RFLP confirmado por sequenciamento. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na distribuição do polimorfismo entre os indivíduos normais e afetados. Outro estudo realizado no Pará pesquisou a presença deste polimorfismo em 200 indivíduos sadios, sem alterações nos níveis de TSH e T₄, detectando sua ocorrência tanto em heterozigose quanto em homozigose (Castro *et al.*, 2010). Estes achados reforçam a idéia de que este polimorfismo não atua na causa da doença, no entanto outros estudos envolvendo diferentes populações tornam-se necessários para a confirmação desses dados.

7. CONCLUSÃO

A análise das genealogias das sete famílias com HC em Monte Santo sugere o padrão de herança autossômico recessivo, exceto em uma família, reforçando a heterogeneidade genética da doença.

A não identificação de mutações no gene TSHR pode sugerir que este, não foi o gene adequado para o presente estudo, o que pode dever-se a falta de uma caracterização clínica e exames adicionais necessários para identificação do possível gene alvo, ou ainda, que exista interação poligênica da doença.

O estudo de mutações em outros genes poderá ajudar no esclarecimento das bases moleculares do HC na região, o que permitirá a realização de aconselhamento genético para as famílias de Monte Santo, além de reforçar a importância da triagem neonatal.

8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A falta de dados clínicos minuciosos são relevantes para o estudo do HC, uma vez que estes possibilitam definir com maior precisão a possível etiologia da doença. Além disso, a falta de exames complementares como: ultrassonografia, cintilografia e teste do perclorato que apontam gene adequado os estudos do HC.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOWICZ, M.J.; 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.** *Experimental and clinical endocrinology and diabetes* (1996) 104: 117-20.

ALBERTI, L.; PROVERBIO, M. C.; COSTAGLIOLA, S.; ROMOLI, R.; BOLDRIGHINI, B.; VIGONE, M. C.; WEBER, G.; CHIUMELLO, G.; BECK-PECCOZ, P.; PERSANI, L. **Germline Mutations of TSH Receptor Gene as Cause of Nonautoimmune Subclinical Hypothyroidism.** *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (2002) 87: 2549-2555.

ALMEIDA, A.M.; GODINHO, T.M.; TELES, M.S.; REHEM, A.P.P.; JALIL, H.M.; FUKUDA, T.G.; ARAÚJO, E.P.; MATOS, E.C.; MURITIBA-JÚNIOR, D.C.; DIAS, C.P.F.; PIMENTEL, H.M.; FONTES, M.I.M.M.; ACOSTA, A.X. **Avaliação do programa de triagem neonatal na Bahia no ano de 2003.** *Revista Brasileira Saúde Materno Infantil* (2006) 6: 85-91.

AVBELJ, M.; TAHIROVIC, H.; DEBELJAK, M.; KUSEKOVA, M.; TOROMANOVIC, A.; KRZISNIK, C.; BATTELINO, T. **High prevalence of thyroid peroxidase gene mutations in patients with thyroid dysmorphogenesis.** *European Journal of Endocrinology* (2007) 156: 511- 519.

BAGATTOLI, R.M.; VAISMAN, M.; LIMA, J.S.; WARD, L.S. **Estudo de adesão ao tratamento do hipotireoidismo.** *Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabólica* (2000) 44: 483-7.

BARRA, G.B.; VELASCO, L.F.R.; PESSANHA, R.P.; CAMPOS, A.M.; MOURA, F.N.; DIAS, S.M.G.; POLIKARPOV, I.; RIBEIRO, R. C.J.; SIMEONI, L.A.; NEVES, F.A.R. **Mecanismo Molecular da Ação do Hormônio Tireoidiano.** *Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabólica* (2004) 48: 23-38.

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

BENEVIDES ,A.M.; LIMA , C.H.V.; LIMA, C.A.; CORRÊA , Â.R.R.; EL HUSNY, A.S.; FERNANDES-CALDATO, M.C. **Perfil epidemiológico de portadores de hipotireoidismo congênito.** *Revista Paraense de Medicina* (2006) 20: 23-26.

BIEBERMANN, H.; SCHÖNEBERG, T.; KRUDE, H.; SCHULTZ, G.; GUDERMANN, T.; GRÜTERS, A. **Mutations of the human thyrotropin receptor gene causing thyroid hypoplasia and persistent congenital hypothyroidism.** *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (1997) 82: 3471-3480.

BRETONES, P.; DUPREZ, L.; PARMA, J.; DAVID, M.; VASSART, G.; RODIEN, P. **A Familial Case of Congenital Hypothyroidism Caused by a Homozygous Mutation of the Thyrotropin Receptor Gene.** *Thyroid* (2001) 11: 977-980.

CASTANET, M.; MARINOVIC, D.; POLAK, M.; LÉGER, J. **Epidemiology of thyroid dysgenesis: the familial component.** *Hormone Research Pediatric* (2010) 73: 231-237.

CASTRO,G.L.C.; ANDRADE,R.C.; ALVES, E.A.C.; PIMENTEL, C.P.; LOPES, P.F.; SANTANA-DA-SILVA, L.C. **Efeito do polimorfismo D727E (éxon 10 do gene TSHR) sobre os níveis de T4 livre e TSH em 200 indivíduos normais.** Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo – ICB/UFPA. Resumo publicado no Congresso brasileiro de genética médica, 2010.

CLIFTON-BLIGH, R.J.; GREGORY, J.W.; LUDGATE, M.; JOHN, R.; PERSANI, L.; ASTERIA, C.; BECK-PECCOZ, P.; CHATTERJEE, V.K.K. **Two Novel Mutations in the Thyrotropin (TSH) Receptor Gene in a Child with Resistance to TSH.** *Journal Clinical Endocrinology Metabolism* (1997) 82: 1094-1100.

COSTAGLIOLA, S.; SUNTHORNTHETVARAKUL, T.; MIGEOTTE, I.; VAN SANDE, J.; KAJAVA, A.M.; REFETTOFF, S.; VASSART, G. **Structure-function relationships of two loss-of-function mutations of the thyrotropin receptor gene.** *Thyroid* (1999) 9: 995-1000.

DE FELICE, M.; DI LAURO, R. **Thyroid Development and Its Disorders: Genetics and Molecular Mechanisms.** *Endocrine Reviews* (2004) 25: 722-746.

DELADOE, J.; PFARR, N.; VUISSOZ, J.M.; PARMA, J.; VASSART, G.; BIESTERFELD, S.; VLIET, V. **Pseudodominant Inheritance of Goitrous Congenital Joachim Pohlenz, and Guy Hypothyroidism Caused by TPO Mutations: Molecular and in Silico Studies.** *Journal Clinical Endocrinology Metabolic* (2008) 93: 627-633.

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.** *Molecular and Cellular Endocrinology* (1996) 117: 253-256 (a).

De ROUX, N.; MISRAHI, M.; BRAUNER, R.; HOUANG, M.; CAREL, J.C.; GRANIER, M.; LE BOUC, Y.; GHINEA, N.; BOUMEDIENNE, A.; TOUBLANC, J.E.; MILGROM, E. **Four Families with Loss of Function Mutations of the Thyrotropin Receptor.** *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (1996) 81: 4229-4235 (b).

DUPREZ, L.; PARMA, J.; VAN-SANDE, J.; RODIEN, P.; DUMONT, J.E.; VASSART, G.; ABRAMOWICZ, M. **TSH Receptor Mutations and Thyroid Disease.** Elsevier (1998) 9: 133-140.

GAGNÉ, 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?.** *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (1998) 83: 1771-1775.

GUOA, T.; ZHANG, F.; GAOA, J.; BIAN, LI.; GAOC X.; MAA, J.; YANG, M.; JI, Q.; DUANA, S.; ZHENG, Z.; LI, R.; FENG, G.; CLAIR, D.ST.; HE, L. **Polymorphisms in the TSHR (thyrotropin receptor) gene on chromosome 14q31 are not associated with mental retardation in the iodine-deficient areas of China.** *Neuroscience Letters* (2005) 382: 179-184.

INZUCCHI, S.E.; BURROW G.N. **The thyroid gland and reproduction.** In: *Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management.* Fourth Edition. Eds. SAMUEL S.C. YEN, ROBERT B. JAFFE, ROBERT L. BARBIERI, 1999.

KOPP, P. **The TSH receptor and its role in thyroid disease.** *CMLS, Cellular Molecular Life Science* (2001) 58: 1301-1322.

KNOBEL, M.; NOGUEIRA, C.R.; MEDEIROS-NETO, G. **Genética Molecular do Hipotireoidismo Congênito.** *Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabólica* (2001) 45: 24-31.

LACERDA, N.S.O.; BOA SORTE, N.Y.C.A.; AMORIM, T. **Panorama da triagem neonatal para o hipotireoidismo congênito na bahia, no período de 2002 a 2009.**

LaFRANCHI, S. **Congenital hypothyroidism: etiologies, diagnosis and management.** *Thyroid* (1999) 9: 735 – 740.

LARSEN, P.R.; DAVIES, T.F. **Hipotireoidismo e tireoidites.** Em: *Willians Tratado de Endocrinologia*, 10ª edição. Editora Elsevier Pharma/Brasil (2005) pp. 28-29.

LINDSAY, R.S.; TOFT, A.D. **Hypothyroidism.** *Lancet* (1997) 349: 413-17.

PARK, S. M.; CHATTERJEE, V. K. K. **Genetics of congenital hypothyroidism.** *Journal of Medical Genetics* (2005) 42: 379-389.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. www.saude.gov.br/alimentação. Acessado em 31 de julho de 2009.

MUSA, M.; HARUN, F.; JUNIT, S.M. **An investigation into the D727E polymorphism in the TSH receptor gene in patients with congenital hypothyroidism.** *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* (2008) 16: 65-69.

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* (2000) 11: 551-559.

NUNES, M.T.; **Hormônios tireoidianos: mecanismo de ação e importância biológica.** *Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabólica* (2003) 47: 639-643.

ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. **Detection of polymorfism of human DNA by gel eletroforesis as Single Strand Conformation Polymorfisms.** *Proceeding of the NATIONAL Academy of Sciences of the United States of America* (1989) 86: 2766-2770.

PANASCI, L.C.; GREEN, D.; FOX, P.; SCHEIN, P. **A phenol technique for extraction of alkylated DNA, RNA and protein from a single tissue sample.** *Analytical Biochemistry* (1997) 83: 677-88.

PARDO, V.L.V. **Rastreamento e estudo funcional de mutações no gene da tireoglobulina associadas a bócio congênito e hipotireoidismo [dissertação].** São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2007.

PERONE, D. **Avaliação do envolvimento dos genes PAX8 e rTSH no hipotireoidismo congênito em pacientes com disgenesia tireoidiana [tese].** São Paulo: Programa de Pós-Graduação em Endocrinologia da Faculdade de Medicina, 2004 (a).

PERONE, D.; TEIXEIRA, S.S.; CLARA, S.A.; SANTOS, D.C.; NOGUEIRA, C.R. **Aspectos Genéticos do Hipotireoidismo Congênito.** *Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabólica* (2004) 48: 62-69 (b).

PEZZUTI, I.L.; DE LIMA, P.P.; DIAS, V.M. **Congenital hypothyroidism: the clinical profile of affected newborns identified by the Newborn Screening Program of the State of Minas Gerais, Brazil.** *Jornal de Pediatria* (2009) 85: 72-79.

POSTIGLIONE, M.P.; PARLATO, R.; RODRIGUEZ-MALLON, A.; ROSICA, A.; MITHBAOKAR, P.; MARESCA, M.; MARIANS, R.C.; DAVIES, T.F.; ZANNINI, M.S.; 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) 99:15462-15467.

RAMOS, H.E.; NESI-FRANÇA, S.; BOLDARINE, V.T.; PEREIRA, R.M.; CHIAMOLERA, M.I.; CAMACHO, C.P.; GRAF, H.; LACERDA, L.; CARVALHO, G.A.; MACIEL, R.M.B. **Clinical and Molecular Analysis of Thyroid Hypoplasia: A Population-Based Approach in Southern Brazil.** *Thyroid* (2009) 19: 61-68.

REED, L.; PANGARO, L. N. **Physiology of the thyroid gland I: synthesis and release, iodine metabolism, and binding and transport.** In: *Principles and practice of endocrinology and metabolism.* Second edition. Ed. Becker, K. L. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1995.

REFETTOFF, S. **The syndrome of resistance to thyroid stimulating hormone.** *Journal of the Chinese Medical Association* (2003) 66: 441-52.

RIBEIRO, E.M.; SILVA, G.B.; MOREIRA, P.L.M.; KARREL, A.; ALBUQUERQUE, A.K.S.; SILVA, A.A. **Triagem neonatal no Hospital César Cals.** *Revista de Pediatria do Ceará* (2002) 3: 27-29.

RODRIGUES, C.F. **Rastreio Molecular do gene da peroxidase da tiróide em doentes com hipotireoidismo congênito [dissertação].** Braga: Escola de Ciências da Universidade do Minho, 2004.

RUBIO, I.G.S.; GALRAO, A.L.; PARDO, V.; KNOBEL, M.; POSSATO, R.F.; CAMARGO, R.R.Y.; FERREIRA, M.A.; KANAMURA, C.T.; GOMES, S.A.; MEDEIROS-NETO, G. **A Molecular Analysis and Long-Term Follow-up of Two Siblings with Severe Congenital Hypothyroidism Carrying the IVS30+1G>T Intronic Thyroglobulin Mutation.** Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabólica (2008) 52: 1337-1344.

RUBIO, I.G.S.; KNOBEL, M.; NASCIMENTO, A.C.; SANTOS, C.L.; TONIOLO, J.V.; MEDEIROS-NETO, G. **Hipotireoidismo Congênito: Recentes Avanços em Genética Molecular.** Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabólica (2002) 46: 391-401.

RUSSO, D.; BETTERLE, C.; ARTURI, F.; CHIEFARI, E.; GIRELLI, M.E.; FILETTI, S. **Binding But Constitutive Receptor Activation in a Family with Resistance to TSH A Novel Mutation in the Thyrotropin (TSH) Receptor Gene Causing Loss of TSH.** Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism (2000) 85: 4238-4242.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS NETO; SIMPSON, A.J. **Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels.** Biotechniques. (1994) 17: 914-21.

SETIAN, N. **Hypothyroidism in children: diagnosis and treatment.** Jornal de Pediatria (2007) 83: 209-216.

SILVA, L.O.; DIAS, V.M.A.; SILVA, I.N.; CHAGAS, A.J. **Hipotireoidismo Congênito Transitório: Perfil das Crianças Identificadas no Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais, Brasil.** Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabólica (2005) 49: 521-528.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. **Hipotireoidismo Congênito.** PROJETO DIRETRIZES. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2005.

SOUZA, C.F.M.; SCHWARTZ, I.V.; GIUGLIANE, R. **Triagem neonatal de distúrbios metabólicos.** Ciência e Saúde Coletiva (2002) 7: 129-137.

SUNTHORNTHPEVARAKUL, T.; GOTTSCHALK, M.E.; HAYASHI, Y.; REFETOFF, S. **Brief report: resistance to thyrotropin caused by mutations in the thyrotropin-receptor gene.** The New England Journal of Medicine (1995) 332: 155-157.

TIOSANO, D.; PANNAIN, S.; VASSART, G.; PARMA, J.; GERSHONI-BARUCH, R.; MANDEL, H.; LOTAN, R.; ZAHARAN, Y.; PERY, M.; WEISS, R.E. 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: 887-894.

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.** Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism (2000) 85: 1001-1008.

TONACCHERA, M.; AGRETTI, P.; DE MARCO, G.; PERRI, A.; PINCHERA A.; VITTI, P.; CHIOVATO, L. **Thyroid Resistance to TSH Complicated by Autoimmune Thyroiditis.** Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism (2001) 86: 4543-4546.

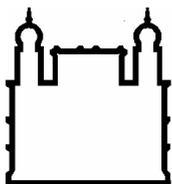
TONACCHERA, M.; BANCO, M.E.; MONTANELLI, L.; DI COSMO, C.; DI COSMO P.; DE MARCO, G.; FERRARINI, E.; ORDOOKHANI, A.; PERRI, A.; CHIOVATO, L.; SANTINI, F.; VITTI, P.; PINCHERA, A. **Genetic analysis of the *PAX8* gene in children with congenital hypothyroidism and dysgenetic or eutopic thyroid glands: identification of a novel sequence variant.** Clinical Endocrinology (2007) 67: 34-40.

TONACCHERA, M.; Di COSMO, C.; De MARCO, G.; AGRETTI, P.; BANCO, M.; PERRI, A.; GIANETTI, E.; MONTANELLI, L.; VITTI, P.; PINCHERA, A. **Identification of TSH receptor mutations in three families with resistance to TSH.** Clinical Endocrinology (2007) 67: 712-8.

VAISMAN, M.; ROSENTHAL, D.; CARVALHO, D.P. **Enzimas Envolvidas na Organificação Tireoideana do Iodo.** Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabólica (2004) 48: 7-13.

VONO-TONIOLO, J.; KOPP, P. **Thyroglobulin gene mutations and other genetic defects associated with congenital hypothyroidism.** Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabólica (2004) 48: 70-82.

YUAN, Z.F.; MAO, H.Q.; LUO, Y.F.; WU, Y.D.; SHEN, Z.; ZHAO, Z.Y. **Tryrotropin receptor and thyroid transcription factor- 1 genes variant in Chinese children with congenital hypothyroidism.** Endocrine Journal (2008) 1-12.



Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-CPqGM
Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ/BA
Laboratório Avançado de Saúde Pública-LASP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: **“Genética no Sertão: Ancestralidade e Bases Moleculares de Doenças Genéticas.”**

Sub-projeto: **“Bases Genéticas do Hipotireoidismo Congênito Não Sindrômico”**

Pesquisador Responsável: Dra. Angelina Xavier Acosta

Profa. Adjunta da FAMED/UFBA

Pesquisadora Colaboradora do CPqGM

Em caso de dúvida entrar em Contato: e-mail: axacosta@hotmail.com, telefones: (71) 3176-2246/ 3176-2213

Propósito e Revisão Geral

Você está sendo convidado(a) a participar como voluntário de um projeto de pesquisa que irá estudar a base molecular, ou seja, irá estudar – analisar, pesquisar – um componente específico (DNA) que está presente nas células (menor parte do corpo humano, que forma os diversos órgãos, como exemplo de órgão podem ser citados: o coração, a pele, o olho e o sangue) e que é responsável pelas características de um indivíduo (pessoa), que são transmitidas de pai para filho, desta forma possibilitando que os filhos se assemelhem (sejam parecidos) em algumas características aos pais. Neste estudo pretende-se analisar este componente das células (DNA) quanto à presença de características iguais entre o paciente com hipotireoidismo congênito (paciente com um mau funcionamento da glândula tireóide) e seus pais. Pretende-se também estudar a ancestralidade (origem da família), ou seja, verificar qual a contribuição de índios, africanos (negros) e europeus (brancos) nestes pacientes (doentes).

Para a análise serão estudadas características genéticas (mutações, alterações, mudanças no DNA). Com estes resultados e os dados da história da família (árvore genealógica) será verificada a associação da ancestralidade com a presença do hipotireoidismo congênito.

Para sabermos o grau de mistura racial em portadores de hipotireoidismo congênito de Monte Santo-BA e/ou seus familiares estudaremos diferenças no material genético (DNA) consideradas como normais, ou seja, não relacionadas com doenças.

A participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Caso você concorde será aplicado um questionário para coleta de dados pessoais, informações sobre o histórico familiar, bem como será realizada a coleta de sangue correspondente a uma colher de sopa cheia, utilizando material apropriado (tubos e agulhas estéreis e descartáveis). Essa coleta poderá provocar desconforto temporário causado pela picada da agulha, queimor, e, muito raramente, hematoma (roxidão) e infecção. A participação no estudo também autoriza que as amostras coletadas sejam armazenadas e possam ser utilizadas em análises futuras, desde que os estudos adicionais sejam analisados pelo Comitê de Ética em Pesquisas – CEP - telefone para contato: (71) 3176-2285.

A pesquisa terá como benefício o esclarecimento da doença e em caso de novos achados o paciente estará assegurado de tratamento na instituição parceira, Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais – APAE/Salvador-BA. Esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a causa do hipotireoidismo congênito em Monte Santo-BA, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possibilite identificar pessoas em risco para o hipotireoidismo congênito de causa genética e, com isso, informar sobre possibilidades de ocorrência/recorrência de novos casos, estabelecendo medidas de saúde para acompanhamento médico e aconselhamento genético (análise feita por profissional especializado para verificar como uma determinada característica que é passada dos pais para o(s) filho(s) aparece e permanece na família e que possibilita estimar a probabilidade – qual a chance, possibilidade – do(s) filho(s) apresentarem esta característica). Os pesquisadores se comprometem a divulgar os resultados obtidos.

Você não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Gostaríamos ainda de esclarecer que a não concordância em participar deste estudo não implicará em nenhum prejuízo referente ao seu acompanhamento médico e/ou do seu

filho. Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu recebi uma cópia deste documento, e tenho o direito de negar ou desistir de participar deste estudo em qualquer momento sem qualquer prejuízo para os cuidados a mim dispensados. A PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA É VOLUNTÁRIA.

Eu _____, R.G. _____ reafirmando que tenho ciência do acima exposto, concordo em participar desse estudo, e estou ciente que tenho:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa a que serei submetido;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso traga prejuízo à continuação dos meus cuidados;
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com minha privacidade (resultados de exames, informações do prontuário médico);
4. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;
5. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa e;
6. O conhecimento de que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

_____, _____ de _____ de 200__

Participante/responsável legal

Pesquisador Responsável

Data de Nascimento: ____ / ____ / ____

RG: _____

Testemunha 1: _____

Testemunha 2: _____



Polegar Direito

FICHA CLÍNICA

Caracterização clínica e molecular do hipotireoidismo congênito em Monte Santo-Bahia-Brasil

Nome: _____ Sexo: M F

D.N: ____/____/____ Naturalidade: _____ Procedência: _____

Estatura ao nascer: _____ Atual: _____

Peso ao nascer: _____ Atual: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Pai: _____ Estatura: _____

Mãe: _____ Estatura: _____

História de consanguinidade (especificar): _____

Data do diagnóstico: _____ Idade ao diagnóstico: _____

Outros casos na família _____

1) CARACTERIZAÇÃO ÉTNICA DO PACIENTE

1.	Cor (Auto-denominação): 1. Negro 2. Mulato/Moreno 3. Branco 0. Outros
2.	Cabelo (Textura): 1. Crespo 2. Ondulado 3. Liso
3.	Cabelo (Cor): 1. Preto 2. Castanho 3. Ruivo 4. Loiro
4.	Nariz (Corpo): 1. Largo 2. Médio 3. Fino
5.	Nariz (Base): 1. Achatada 2. Média 3. Elevada
6.	Lábios (Forma): 1. Grossa 2. Média 3. Fina
7.	Olhos (Cor): 1. Claro 2. Escuro
8.	Pele (Cor): 1. Preta 2. Marrom 3. Branca
9.	Cor (Classificação): 1. Negro 2. Mulato Escuro 3. Mulato Médio 4. Mulato Claro 5. Branco 0. Outros

2) CARACTERIZAÇÃO ÉTNICA DOS PAIS E AVÓS DO PACIENTE

10.	Pai 1. Negro 2. Mulato 3. Branco 4. Índio 5. Outro:	0. Não sabe informar
11.	Mãe 1. Negro 2. Mulato 3. Branco 4. Índio 5. Outro:	0. Não sabe informar
12.	Avó Materna 1. Negro 2. Mulato 3. Branco 4. Índio 5. Outro:	0. Não sabe informar
13.	Avô Materno 1. Negro 2. Mulato 3. Branco 4. Índio 5. Outro:	0. Não sabe informar
14.	Avó Paterna 1. Negro 2. Mulato 3. Branco 4. Índio 5. Outro:	0. Não sabe informar
15.	Avô Paterno 1. Negro 2. Mulato 3. Branco 4. Índio 5. Outro:	0. Não sabe informar

3) QUADRO CLÍNICO AO DIAGNÓSTICO: _____

SINTOMÁTICO ASSINTOMÁTICO

4) PRESENÇA DE PATOLOGIA ASSOCIADA? SIM NÃO

5) DESCRIÇÃO DA PATOLOGIA ASSOCIADA: _____

6) DADOS LABORATORIAIS:

	DATA	RESULTADO (Valor Referência)	MÉTODO	LOCAL
T3				
T4				
T4 Livre				
TSH				

7) FAZ TRATAMENTO? SIM NÃO

8) DATA DE INÍCIO/ QUAL (IS) DROGA (S)? _____

9) OUTROS EXAMES REALIZADOS: _____

10) DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO: _____

Parecer nº 18/2008

Instituição: APAE - Salvador

Setor: NUPEC

Projeto Avaliado: “Bases Moleculares do Hipotireoidismo Congênito Não-sindrômico (HCNS)”

Proponentes: Taise Lima de Oliveira, orientada por Angelina Acosta e Ana Cláudia Couto;

Instituição: LASP/FIOCRUZ-BA;

Tema abordado: Bases moleculares do HCNS;

Objetivo do estudo: “Geral: Investigar as bases moleculares associadas ao Hipotireoidismo Congênito Não-sindrômico em pacientes da região de Monte Santo – Bahia e seus familiares; Específicos: 1. Obter genealogia das famílias dos afetados para determinação do padrão de herança, identificação de afetados e possíveis portadores; 2. Determinar a distribuição mutacional no gene do receptor do Hormônio Estimulante da Tireóide (TSHR) e no gene da Tireóide Peroxidase (TPO) nos pacientes com HCNS; 3. Compreender as bases genéticas envolvidas na gênese do HCNS existente nessa região; 4. Sugerir ações de saúde pública e de otimização do aconselhamento genético”.

Local do estudo: Trabalho de campo em Monte Santo, Bahia; Trabalho laboratorial na FIOCRUZ-BA, Coleta de dados clínicos no SRTN, APAE Salvador;

Amostra: “Dez propósitos e seus familiares, totalizando aproximadamente 30 indivíduos”;

Método: “Resposta a questionário para coleta de dados individuais, de ancestralidade, história familiar e clínica. Coleta de 5 ml de sangue, extração de DNA, PCR e SSCP com sequenciamento do DNA”.

Comentários:

O projeto ora proposto está bem fundamentado e está inserido na proposta de uma pós-graduação conceituada da cidade de Salvador. Seguem alguns comentários/dúvidas/sugestões:

- 1) O projeto prevê a coleta de dados clínicos dos pacientes acompanhados no SRTN da APAE Salvador. Devido à impossibilidade de deslocar uma pessoa da equipe do SRTN para realizar esta coleta, pergunta-se:**
 - a. A líder de atendimento do SRTN: será factível a liberação das consultas do prontuário médico pelos proponentes?**
 - b. A proponente: existe a possibilidade de um bolsista da área médica realizar esta coleta, uma vez que o acesso ao prontuário deverá ser feito por um estudante ou profissional de medicina?**
- 2) A coleta de sangue será realizada no SRTN em algum momento? Em caso afirmativo esclarecer em que situação isso ocorrerá para verificar a possibilidade e como isto poderia ser organizado na rotina do serviço.**
- 3) O projeto foi aprovado pelo CEP da instituição proponente? Em caso afirmativo, por gentileza, envie o parecer favorável conjuntamente com o projeto.**

Encaminho o projeto para parecer de dois membros do NUPEC para realizarmos o parecer definitivo.

Salvador, 09 de dezembro de 2008,

Ney Boa Sorte
Assessor Técnico – Pesquisa Científica
APAE/Salvador